



TITLE:

樹状突起サイズのスケーリング機構の研究(Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

下野, 耕平

CITATION:

下野, 耕平. 樹状突起サイズのスケーリング機構の研究. 京都大学, 2014, 博士(生命科学)

ISSUE DATE:

2014-05-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k18484>

RIGHT:

樹状突起サイズの スケーリング機構の研究

下野耕平

目次

論文要旨	3
略語表.....	4
第 1 章 序論.....	5
1.1. 体のサイズに合わせた器官サイズのスケーリング	5
1.2. IIS/TORC1 シグナル伝達経路による細胞サイズの制御.....	6
1.3. 樹状突起サイズの制御機構	8
1.4. ショウジョウバエ成虫の da neuron	10
第 2 章 体のサイズに合わせた樹状突起サイズのスケーリング.....	12
2.1. v'ada ニューロンは体のサイズに合わせて分岐パターンを保ちながら樹状突起の サイズを調節する.....	12
2.2. IIS/TORC1 シグナル伝達経路の変異体は「成長不全表現型」を示す	15
第 3 章 進化的に保存されたタンパク質 CHORD による樹状突起サイズ制御	18
3.1. CHORD 変異ニューロンはミニチュア型の樹状突起を形成する.....	18
3.2. CHORD 変異ニューロンは体のサイズに関わらずミニチュア型の樹状突起を形成 する	21
3.3. 樹状突起のサイズ制御への HSP90 の関与の検証.....	23
3.4. CHORD と Rho-kinase の遺伝学的相互作用の検証	24
3.5. CHORD は TORC2 の下流として機能する	28
3.6. 伸長・退縮の速度の違いによってミニチュア表現型を説明できる	32
第 4 章 考察.....	37
4.1. 樹状突起サイズの調節には異なる 2 つの様式が存在する.....	37
4.2. 樹状突起サイズの制御における CHORD の役割.....	38
4.3. 進化の過程で見られる樹状突起サイズのスケーリング	39
4.4. 幼虫期 da neuron の樹状突起のサイズ調節機構との比較.....	40
4.5. da neuron が体のサイズを感知する機構	40
第 5 章 補遺.....	42
5.1. CHORD と相互作用が予測されている分子の解析	42
5.2. 新規の CHORD 結合タンパク質の探索.....	48
5.3. CHORD の上流に存在する受容体の探索.....	55

第 6 章 材料と方法	58
6.1. 分子生物学的手法	58
6.2. 遺伝学的スクリーニング	60
6.3. ショウジョウバエ関連	63
6.4. ライブイメージング	66
6.5. 定量化と統計処理	67
6.6. 培養細胞とトランスフェクション、RNAi	69
6.7. 生化学関連	69
6.8. コンピュータシミュレーション	71
引用文献	73
謝辞	79

論文要旨

多くの器官のサイズは、体のサイズの変化に応じて適切に変化することが知られている。こうした器官のサイズのスケーリングの一つの様式として、個々の細胞のサイズを変更する方法がある。この細胞のサイズの制御には、Insulin/IGF signaling (IIS) and Target of Rapamycin complex 1 (TORC1) シグナル伝達経路 (IIS/TORC1 シグナル伝達経路) が重要な役割を果たすことが知られている。しかし、神経細胞のような複雑な形態を持つ細胞が、体のサイズに応じてどのようなスケーリングを行っているか、またその分子機構は明らかになっていなかった。

私は、ショウジョウバエ末梢神経系の dendritic arborization (da) neuron をモデル系として、体のサイズを変化させた時に樹状突起パターンがどのような影響を受けるかを調べた。その結果、飢餓条件下において体のサイズを小さくすると、分岐パターンを保ったまま全体が縮小したミニチュア型の樹状突起を形成することが明らかとなった。一方、IIS/TORC1 シグナル伝達経路の変異ニューロンは樹状突起サイズが小さくなるだけでなく、分岐パターンも単純化するという「成長不全表現型」を示した。従って、野生型ニューロンにおける樹状突起サイズのスケーリングには新規の分子が関与している可能性が示唆された。

そこで遺伝学的なスクリーニングを行ったところ、体のサイズに関わらずに常にミニチュア型の樹状突起を形成する変異体を分離し、進化的に保存された HSP90 のコシャペロンをコードする *CHORD/morgana* 遺伝子を原因遺伝子として同定した。遺伝学的、生化学的、そして樹状突起ダイナミクスの解析の結果、IIS/TORC1 シグナル伝達経路が突起の伸長と分岐の両方を制御しているのに対して、CHORD は TORC2 と共に突起の伸長のみを制御することで、形を保ったままの樹状突起サイズのスケーリングを実現していることが示唆された。

略語表

<タンパク質名（遺伝子名）>

頭文字が大文字の場合はタンパク質名、頭文字が小文字でイタリック表記の場合は遺伝子名を表す。

CFIm	Cleavage Factor Im
Dinr	Drosophila insulin receptor
HSP90	Heat shock protein 90
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
Raptor	Regulatory associated protein of TOR
Rictor	Rapamycin-insensitive companion of TOR
Rok	Rho-kinase
Sqh	Spaghetti squash
Tor	Target of Rapamycin
TORC1	Tor complex 1
TORC2	Tor complex 2

<その他の用語>

AEL	after egg laying
APF	after pupal formation
da neuron	dendritic arborization neuron
MARCM	Mosaic analysis with repressible cell marker
SOPs	sensory organ precursors

第1章 序論

1.1. 体のサイズに合わせた器官サイズのスケーリング

動物の大きさは種ごとにほぼ決まっており、それぞれの種の体の構造や生態に大きな影響を与えている。例えば、細菌やプランクトンといった微生物は鞭毛や繊毛で泳いでいるのに対して、魚のような大型生物は体をくねらせることで推進力を得ている。この遊泳方式の違いは、体のサイズが小さいときには粘性による作用が、体のサイズが大きい場合は慣性による作用が、それぞれ支配的となることによって説明される (Schmidt-Nielsen, 1984)。

一方で、同一種内であっても、環境条件によって体の大きさにはバラつきがあることが知られている。例えば、ショウジョウバエにおいては、発生時期の栄養枯渇によって、成虫のサイズ（体重）を15%まで減少させることができる (Beadle et al., 1938; Edgar, 2006; Lloyd, 2013)。このような体のサイズの変化に応じて、それぞれの器官のサイズも適切に変化することが知られており、こうした組織のサイズのスケーリングは多くの動物で共通に認められる。一般的には、

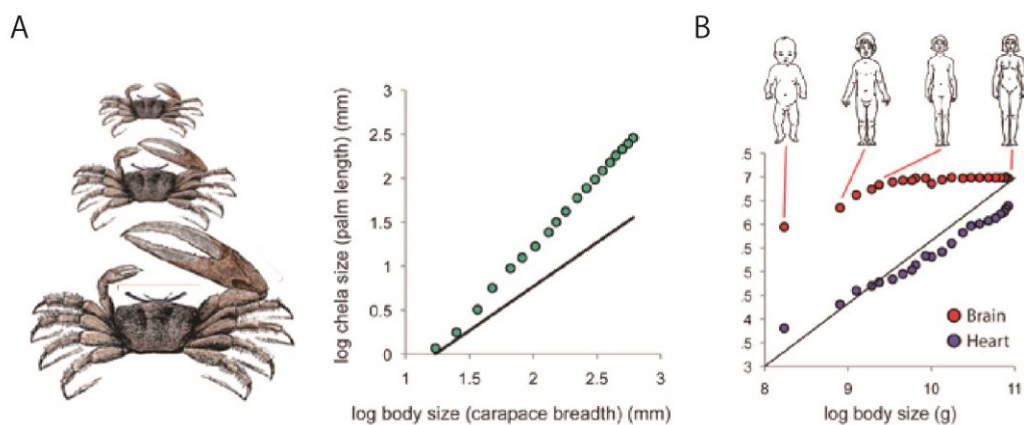


図1. 体のサイズと器官のサイズの間のアロメトリック関係

(A) オスのシオマネキの体のサイズとはさみのサイズの関係。(B) 脳または心臓のサイズと体のサイズの関係。グラフは両対数表示であり、実線は両者の間に比例関係が成り立つときを示している。Shingleton A, 2010 を元に改変。

体のサイズと器官のサイズの間には単純な比例関係ではなく、べき乗則が成り立つことが知られており（図 1）、このような非相似的なスケーリングは、アロメトリ的スケーリングと呼ばれている（Huxley and Tessier, 1936）。

1.2. IIS/TORC1 シグナル伝達経路による細胞サイズの制御

器官のサイズは、器官を構成する細胞の数と個々の細胞のサイズによって決定される。従来、器官のサイズは細胞数によって調節されていると考えられてきたが、近年の研究から細胞サイズの制御の重要性も指摘されている（Su and O'Farrell, 1998）。例えばショウジョウバエでは、飼育温度を下げると翅や脚、眼といった器官のサイズが増加するが、これは細胞の数ではなく個々の細胞のサイズが増加することに起因する（Azevedo et al., 2002）。つまりこの場合、細胞のサイズと器官や体のサイズの上にスケーリングの関係が成立していると言える。

これまでの研究から、細胞のサイズの制御には Insulin/IGF signaling (IIS) and Target of Rapamycin complex 1 (TORC1) シグナル伝達経路（以後 IIS/TORC1 シグナル伝達経路と呼ぶ）が重要な役割を果たすことが明らかにされてきた（Hietakangas and Cohen, 2007; Lloyd, 2013; Stocker and Hafen, 2000; Tumaneng et al., 2012）。例えば、マウスとショウジョウバエのどちらにおいても、insulin receptor substrate-1 (IRS-1) が欠失すると、細胞のサイズ、ひいては体のサイズが大きく減少する（Böhni et al., 1999; Pete et al., 1999）。Insulin や IGF は進化的によく保存されたペプチドホルモンであり、栄養に応じて血中あるいは体液中の濃度が変化する。Insulin/IGF は細胞表面上のインスリン様受容体（Insulin-like receptor）に結合し、Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) や AKTなどを介して TORC1 を活性化する。TORC1 は、Target of Rapamycin (TOR) や regulatory associated protein of TOR (Raptor) などからなる複合体であり、アミノ酸レベルや ATP レベルなどの情報も統合する、栄養シグナルの「ハブ」として機能している。活性化した TORC1 は、栄養の取り込みやタンパク質合成の促進、オートファジーの抑制といった代謝の制御を通して、細胞成長を促進する（図 2）。しかしながら、これらの研

究は主に上皮細胞などの比較的単純な形態の細胞を用いて行われており、神経細胞のような複雑な形態を持つ細胞のサイズがどのように制御されているのかを調べた例は少ない。特に、神経細胞のサイズと体のサイズの間にはどのようなスケーリング関係があるのかについては、これまで全く明らかになっていなかった。

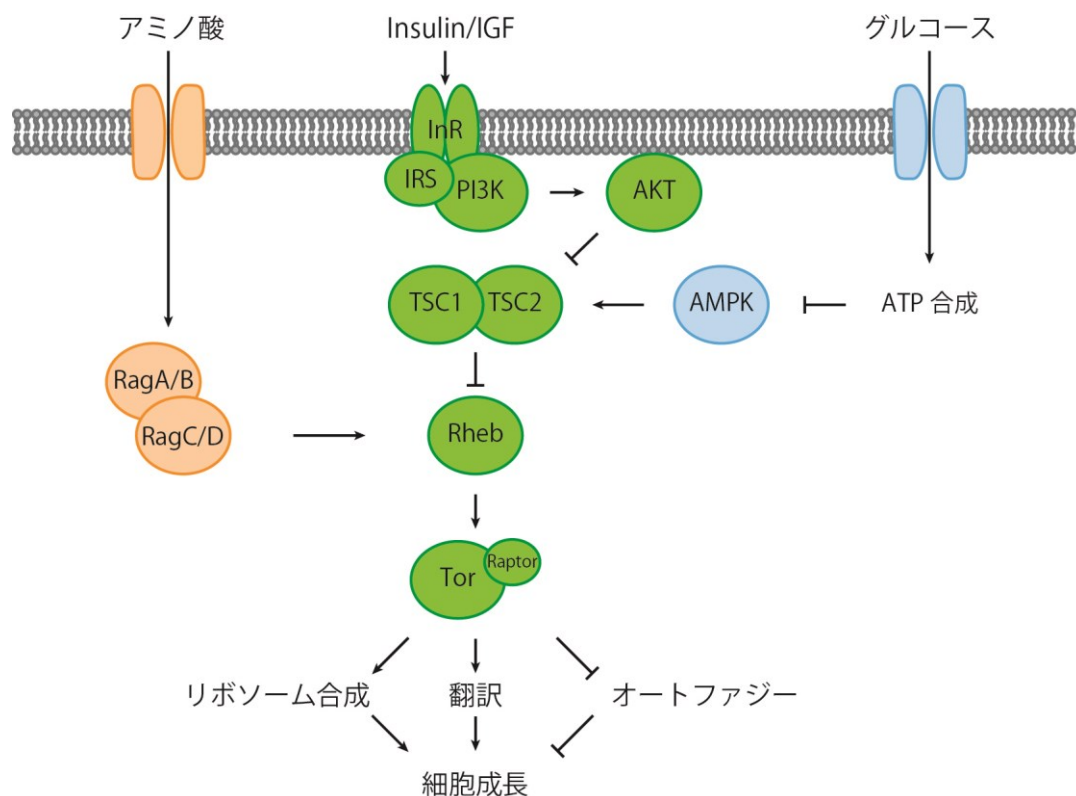


図 2. IIS/TORC1 シグナル伝達経路

IIS/TORC1 シグナル伝達経路の模式図。Tor と Raptor からなる TORC1 は、Insulin/IGF を介して全身の栄養条件を、Rag GTPase を介してアミノ酸レベルを、AMPK を介して細胞内のエネルギー状態を、それぞれ感知している。これらの情報を統合し、翻訳やオートファジーを制御することで細胞成長を調整している。Tumaneng et al., 2012 を元に改変。

1.3. 樹状突起サイズの制御機構

神経細胞は高度に極性化された細胞であり、軸索と樹状突起という2種類の突起を持っている。樹状突起は他の神経細胞からの情報を受け取るアンテナとして働き、その情報は軸索を通して他の神経細胞へと伝えられる。樹状突起の形態は実に様々であり、神経細胞ごとの生理機能の違いに寄与していると考えられている (図3) (London and Häusser, 2005; Stuart et al., 2007)。

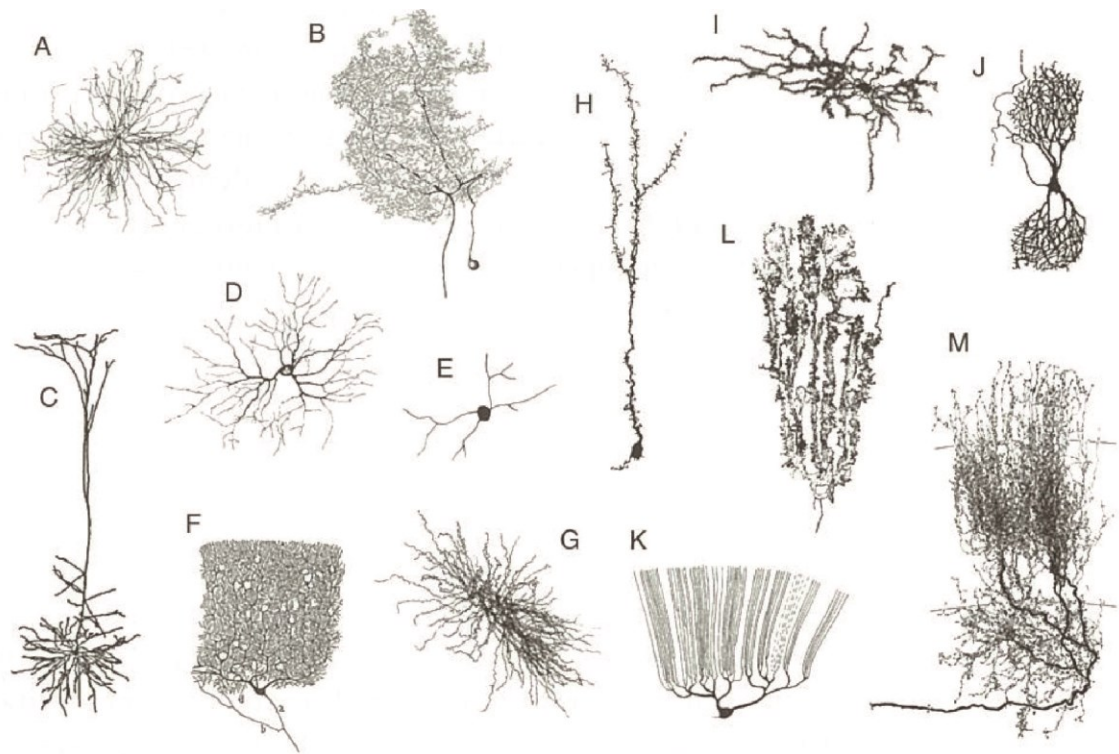


図3. 神経細胞の樹状突起パターンの多様性
Stuart et al., 2007 より引用。

ショウジョウバエやマウスの変異体を用いた解析から、IIS/TORC1 シグナル伝達経路は、樹状突起の形態形成に関与していることが示されている (Jaworski and Sheng, 2006; Jaworski et al., 2005; Kumar et al., 2005; Swiech et al., 2011; Urbanska et al., 2012)。しかしながら、野生型の個体において、体のサイズの違いが個々の神経細胞の樹状突起のサイズや形態にどのような影響を与えるのか、またそのような樹状突起のスケーリングにも IIS/TORC1 シグナル伝達経路が関与しているのかについては、これまで全く明らかになっていなかった。

この原因の一つとして、同じ種類に分類される神経細胞であっても、その樹状突起のサイズや形態にはかなりの多様性が存在することが挙げられる。実際、マウス大脳皮質の錐体細胞の樹状突起サイズは領野ごとに異なっている (図 4) (Benavides-Piccione et al., 2006)。このような神経細胞では、体のサイズによる影響が細胞間でのバラつきに埋もれてしまい、体のサイズが樹状突起のサイズに与える影響を検証することは難しい。そこで私は、ステレオタイプな樹状突起パターンを示す、ショウジョウバエ成虫の dendritic arborization (da) neuron に注目し、モデル系として立ち上げた。

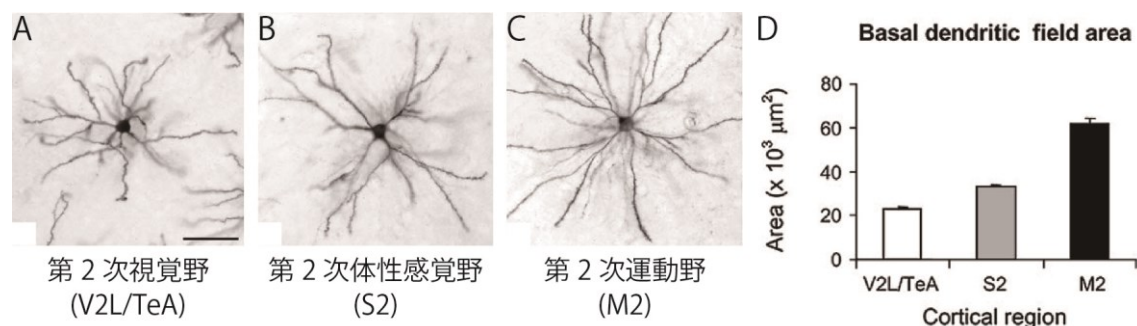


図 4. 領野ごとの樹状突起サイズの違い

(A-C) マウスの大脳皮質の異なる領野における 2/3 層の錐体細胞の基底樹状突起の形態。基底樹状突起は、第 2 次視覚野 (A; the lateral secondary visual cortex and association temporal cortex)、第 2 次体性感覚野 (B; the secondary somatosensory cortex)、第 2 次運動野 (C; the secondary motor cortex) の順に大きくなっている。スケールバーは $60 \mu m$ 。(D) 樹状突起サイズの定量化。Benavides-Piccione et al., 2006 を元に改変。

1.4. ショウジョウバエ成虫の da neuron

da neuron は末梢神経に存在する感覚ニューロンの一種であり、幼虫期にはそれぞれステレオタイプな形態の樹状突起を発達させる (Grueber et al., 2002)。da neuron は樹状突起を表皮と筋肉の間に二次元的に展開する (図 5B) ので、樹状突起パターン形成機構の研究の有用なモデル系として用いられてきた (Jan and Jan, 2010; Parrish et al., 2007)。da neuron はその樹状突起パターンの複雑さによってクラス I からクラス IV の 4 つのクラスに分類されている。中でも、クラス IV da neuron の樹状突起は、幼虫の体表を完全にかつ重複なく覆うことが知られており、この現象はタイリングと呼ばれている。このタイリングを維持するために、クラス IV da neuron は幼虫の成長に合わせて樹状突起サイズを増大させることが報告されており、樹状突起の「スケーリング的成長」を研究するモデル系となることが提唱されている (Parrish et al., 2009)。

蛹期において、一部の da neuron では、軸索と細胞体を残したまま幼虫型の樹状突起が取り除かれ、新たに成虫型の樹状突起が展開されることが知られている (Kuo et al., 2005; Shimono et al., 2009; Williams and Truman, 2004, 2005)。クラス IV da neuron の v'ada ニューロンは、成虫においても腹部体表をくまなく覆っていることが示されている (図 5C と D)。従って、体のサイズが違う個体では、v'ada ニューロンの樹状突起サイズも異なることが予想される。つまり、v'ada ニューロンをモデル系として用いることで、個体のサイズと樹状突起のサイズや形態の間にどのような関係があるかを明らかにできると考え、本研究を開始した。

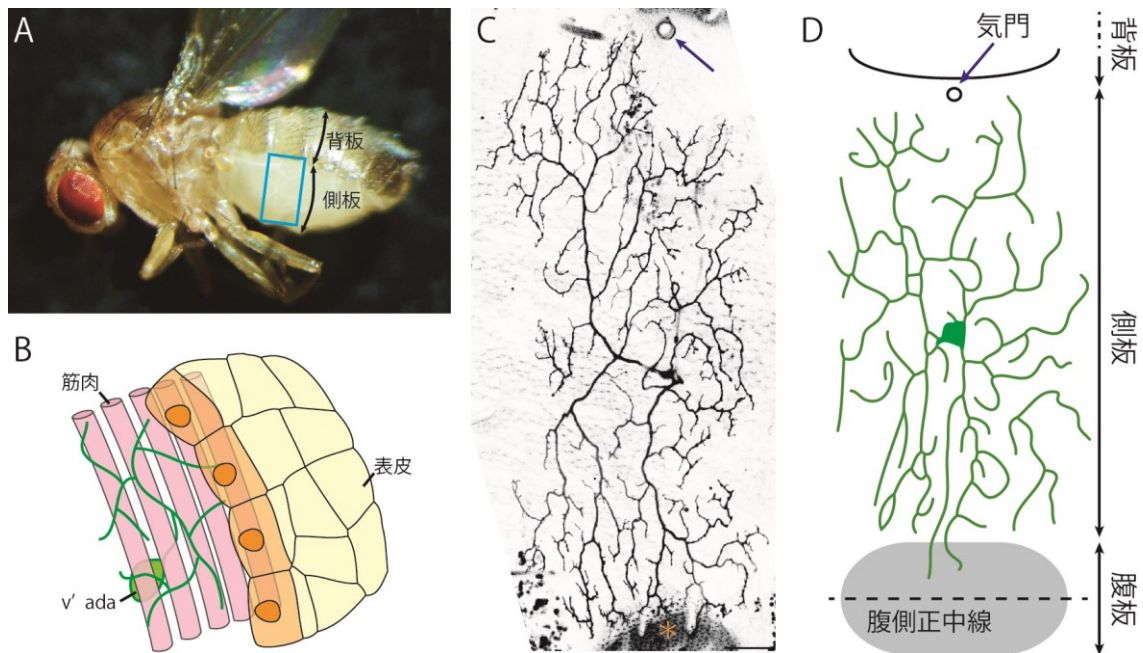


図5. ショウジョウバエ成虫の $v'ada$ ニューロン

(A) ショウジョウバエ成虫の写真（京都大学理学研究科布施直之博士撮影）。(B) $v'ada$ ニューロンと表皮や筋肉の位置関係を表した模式図。 $v'ada$ の細胞体は筋肉より深部に存在し、樹状突起は筋肉と表皮の間に二次元的に展開している。(CとD) (A)の青色の四角で囲まれた領域の拡大写真 (C) と模式図 (D)。 $v'ada$ で膜結合型 Venus を発現させることで細胞の形態を可視化している。野生型の神経細胞は、気門（矢印）と腹板（アスタリスク）で挟まれた側板領域全体を覆う大きな樹状突起を展開している。スケールバーは $50\ \mu\text{m}$ 。

第2章 体のサイズに合わせた樹状突起サイズのスケールリング

2.1. v'ada ニューロンは体のサイズに合わせて分岐パターンを保ちながら樹状突起のサイズを調節する

ショウジョウバエやタバコスズメガでは、体重が critical weight と呼ばれる閾値を越えた後に幼虫を飢餓状態に晒すと、発生時間は遅れることなく、小さいサイズの成虫が羽化することが知られている（図 6A）（Beadle et al., 1938; Edgar, 2006; Mirth and Riddiford, 2007; Mirth and Shingleton, 2012; Tennessen and Thummel, 2011）。私は、この現象を利用して、成虫の体のサイズの変化が da neuron の樹状突起の形態とサイズにどのような影響を与えるかを調べることにした。

critical weight を超えるまでの発生時間は、個体の遺伝子型や生育環境によって異なるが、一般的には産卵後 70 時間（70 hr after egg laying; 70 hr AEL）程度で

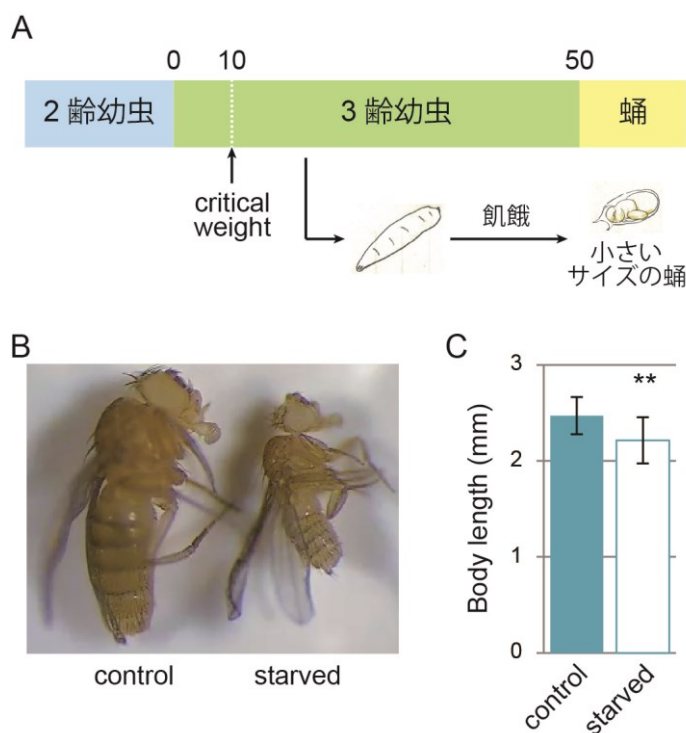


図 6. 幼虫期の飢餓による成虫の体のサイズの減少

(A) ショウジョウバエの発生期における飢餓の影響。数字は 3 齢幼虫になってからの時間 (hr) を示している。Critical weight (70 hr AEL に相当) を越えた後に幼虫を飢餓条件に移すと、小さいサイズの蛹になる。Mirth and Riddiford, 2007 を元に改変。(B と C) 通常の栄養条件下 (左) と 91~97 hr AEL から飢餓条件下で飼育したショウジョウバエ (右) の写真 (B) と体長の定量化 (C)。データは平均値 ± 標準偏差で示している。** $p < 0.0$ (Student's t-test)。

あるとされている。そこで、critical weight を十分に超えた 91~97 hr AEL の幼虫を飢餓条件に晒したところ、ほとんどの個体は成虫まで発生し、体のサイズは有意に減少していた（図 6B と C）。

この時の v'ada ニューロンの樹状突起パターンを観察したところ、飢餓条件下では顕著に樹状突起のサイズが減少しているものの、分岐パターンそのものは大きく変化していないように見えた（図 7A と B）。つまり、飢餓条件下ではコントロールの「ミニチュア型」の樹状突起パターンを形成していることに気づいたのである。この印象を確認するため、樹状突起パターンの定量的な解析を行った（詳細は材料と方法を参照）。その結果、飢餓条件下で生育した個体では、樹状突起のサイズは顕著に減少していた（図 7C）のに対して、細胞当たりの樹状突起の末端数には変化がなかった（図 7E）。また、樹状突起の長さや末端数を樹状突起サイズで割ることで樹状突起の密度を計算したところ、飢餓条件下で生育した個体で有意に増加していた（図 7F と G）。さらに、Strahler の方法（図 7H）を用いてそれぞれの枝に次数を割り当て、各次数の枝の平均の数と平均長を定量化したところ、体のサイズを小さくすると、2 次から 4 次の枝の平均の長さが有意に減少し、平均の数は変化しないことが分かった（図 7I と J）。以上の結果から、v'ada ニューロンは、体のサイズに応じて、分岐パターンを保ったまま分岐点間隔（セグメント長）を変更することで樹状突起のサイズを調節していることが示唆された。

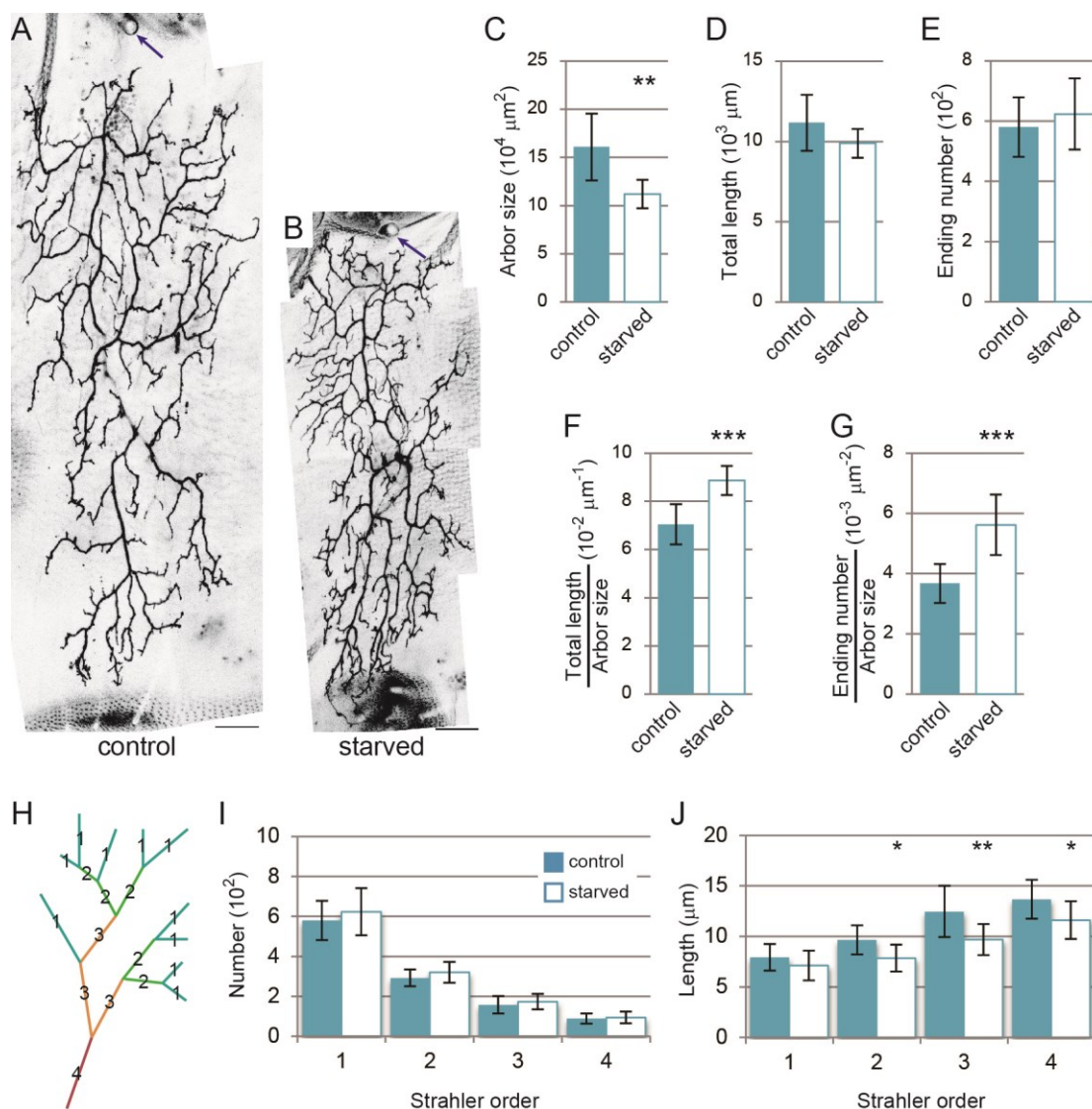


図 7. 野生型 *da neuron* の樹状突起サイズのスケーリング

(A と B) コントロール (A) または飢餓条件下 (B) での *v'ada* ニューロンの観察像。矢印は気門を示す。スケールバーは $50 \mu m$ 。(C-J) 各条件下での樹状突起パターンの定量データ。樹状突起のサイズ (C)、樹状突起長 (D)、末端数 (E)、樹状突起の密度 (F と G)、各次数のセグメントの平均数 (I) と平均長 (J) を定量化した。樹状突起長/樹状突起サイズ (F)、または末端数/樹状突起サイズ (G) を樹状突起密度として定義した。セグメントごとの次数の定義には Strahler の方法 (H; Strahler, 1953) を用いた。具体的には、最も末端のセグメントを次数 1 とし、その他のそれぞれのセグメントについて、娘のセグメントが異なる次数であれば最も大きな次数を、同じ次数であればその次数に 1 を足した値を、それぞれそのセグメントの次数として定義した。データは平均値 ± 標準偏差で示した。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ (Student's t-test)。

2.2. IIS/TORC1 シグナル伝達経路の変異体は「成長不全表現型」を示す

以上の結果は、野生型の神経細胞が体のサイズ、もしくは栄養条件に応答し、分岐パターンを保ちながら樹状突起のサイズを調節していることを示唆している。私は、細胞のサイズの制御に重要な IIS/TORC1 シグナル伝達経路 (図 2) が、このような樹状突起のスケーリングにも関与しているのではないかと考え、IIS/TORC1 シグナル伝達経路を阻害した時に、樹状突起のサイズにどのような影響があるかを調べた。

Drosophila insulin receptor (dinr) や *Akt* の変異ニューロンでは、樹状突起のサイズ、突起長、末端数が野生型に比べて有意に減少したのに対して、樹状突起の密度には差はなかった (図 8)。PI3K のドミナントネガティブ型の過剰発現や *raptor* のノックダウン、そして *tor* の変異ニューロンにおいても同様の異常が見られた (図 8)。つまり、IIS/TORC1 シグナル伝達経路を抑制すると、樹状突起のサイズは減少するものの、分岐の複雑度も低下してしまうことが分かった。この表現型は「成長不全表現型」と表現できるものであり、体のサイズの減少に応じて起こる樹状突起のミニチュア化とは異なるものである (図 9)。従って、*da neuron* の樹状突起のサイズの制御には、IIS/TORC1 シグナル伝達経路以外の新しい因子が関与している可能性が示唆された。

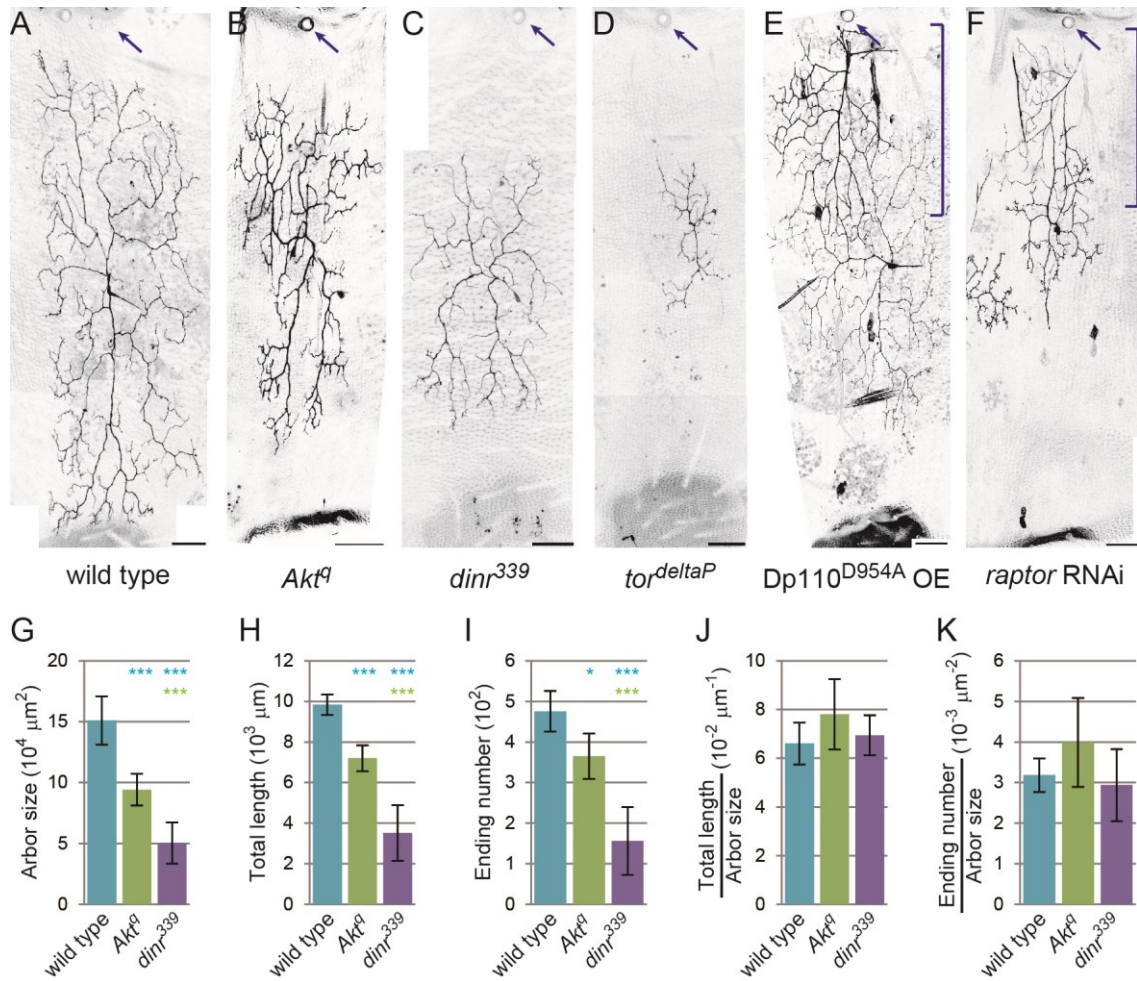


図 8. IIS/TORC1 シグナル伝達経路の変異体は「成長不全表現型」を示す

(A-F) 野生型ニューロン (A)、*Akt* 変異ニューロン (B)、*drosophila insulin receptor* (*dinr*) 変異ニューロン (C)、*target of rapamycin* (*tor*) 変異ニューロン (D)、PI3K のドミナントネガティブ型を過剰発現したニューロン (E)、*raptor* ノックダウンニューロン (F) の観察像。矢印は気門を示す。スケールバーは 50 μm。E と F では *vada* ニューロンと隣接する *IdaA*/*IdaA*-like ニューロンの樹状突起(括弧で示した)もラベルされている。(G-K) 各遺伝子型のニューロンの樹状突起パターンの定量データ。樹状突起のサイズ (G)、樹状突起長 (H)、末端数 (I)、樹状突起の密度 (J と K) を定量化した。データは平均値 ± 標準偏差で示した。**p* < 0.05、***p* < 0.01、****p* < 0.001 (one-way ANOVA with Tukey's HSD post hoc test)。青字は野生型との、緑字は *Akt* 変異ニューロンとの間で比較した値を示している。

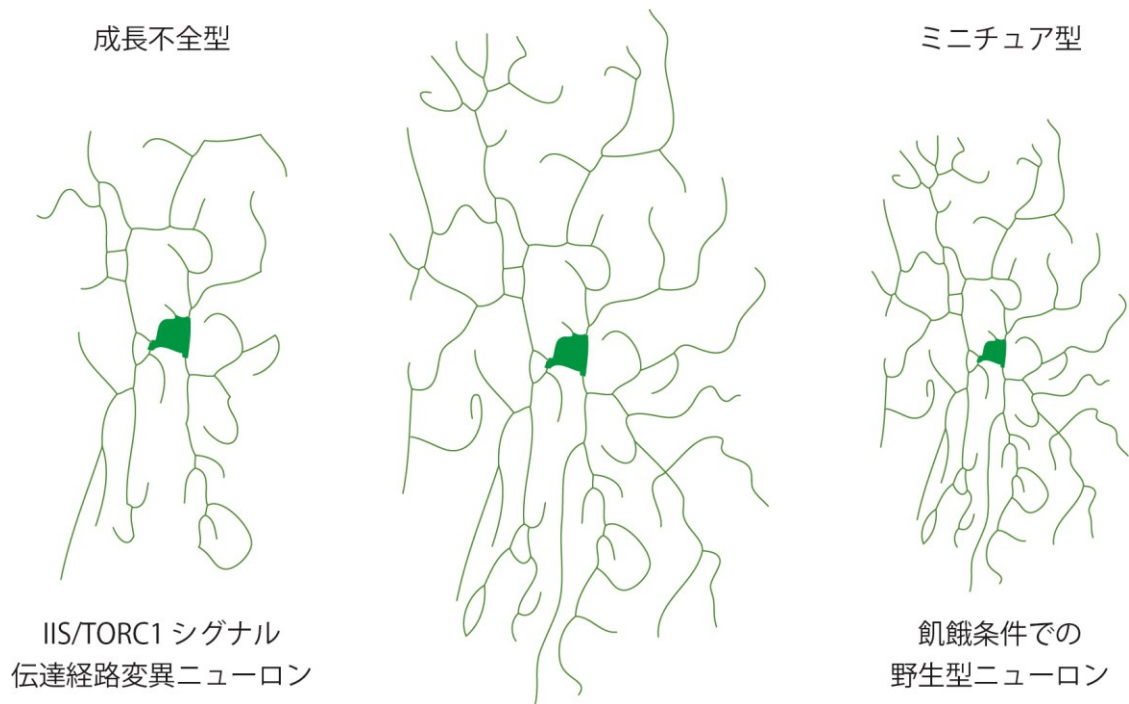


図 9. 樹状突起のサイズを小さくする異なる2つの様式

樹状突起の「サイズ」を調節する様式として、①分岐間隔を保ったまま、分岐の数を調節する方法（左）と、②分岐の数を保ったまま分岐の間隔を変化させることで拡大縮小する方法（右）の2つの様式があることが考えられる。これまでの実験結果より、野生型の *v'ada* ニューロンでは②のタイプのサイズ制御が行われていることが分かった。IIS/TORC1 シグナル伝達経路の変異ニューロンが①のタイプの異常を示したことから、野生型ニューロンの樹状突起サイズの制御には IIS/TORC1 シグナル伝達経路とは異なるシグナル伝達経路が関与している可能性が示唆された。

第3章 進化的に保存されたタンパク質 CHORD による樹状突起サイズ制御

3.1. CHORD 変異ニューロンはミニチュア型の樹状突起を形成する

次に私は、樹状突起サイズの制御に関わる遺伝子を同定するために、Mosaic analysis with a repressible cell marker (MARCM) 法 (Lee and Luo, 1999) を用いた順遺伝学的なスクリーニングを行った。

MARCM 法を用いると、大部分の細胞は突然変異をヘテロに持つ中で一部の細胞（クローン）だけが突然変異をホモに持つような個体を作製することができる。つまり、本来ホモでは発生途中に致死となる突然変異であっても個体として生存させることができ、発生後期や成体での目的遺伝子の機能を調べることができる。まず私は、MARCM 法を改良し、簡便にかつ効率よく da neuron で目的遺伝子の機能を欠失させる方法の開発を試みた。具体的には、da neuron の前駆細胞である Sensory Organ Precursor (SOP) 特異的に組み換え酵素 FLP を発現するトランスジェニックショウジョウバエを作製し、従来よりも約 10 倍高い効率で da neuron のクローンを誘導することに成功した（図 10）。

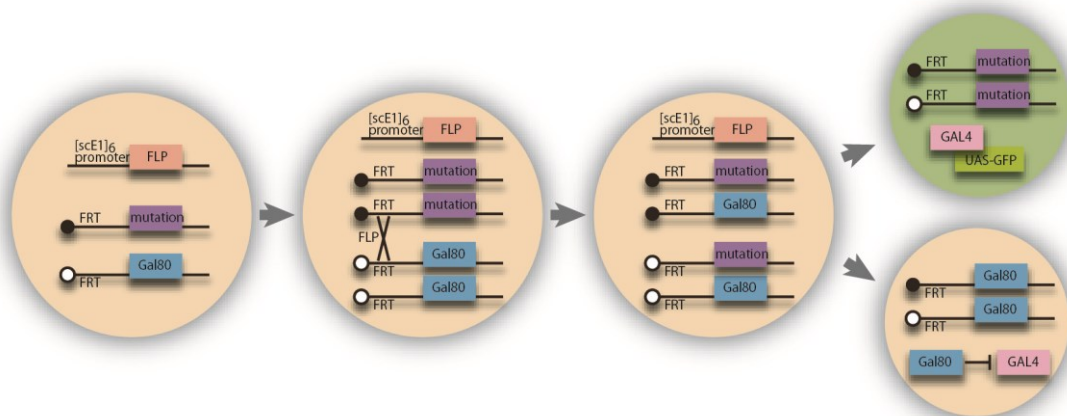


図 10. SOP-FLP を用いた MARCM 法

Sensory Organ Precursor (SOP) で発現する FLP (SOP-FLP) を用いた MARCM 解析法の模式図。SOP 特異的なシス配列である[scE1]₆によって FLP の発現が誘導され、体細胞組み換えが起こる。結果として、突然変異をヘテロに持つ親細胞から変異をホモに持つ細胞が産まれる。

約 1500 系統の変異体系統を対象に、この方法を用いた順遺伝学的なスクリーニングを行い、通常の栄養条件においてもミニチュア型の樹状突起パターンを形成する変異体を分離した（詳細は材料と方法を参照）。実際に、この変異ニューロン (*CHORD*²) の樹状突起パターンの定量解析を行ったところ、野生型と比べて、樹状突起のサイズ（図 11D）と総突起長（図 11E）、そして各次数の枝の平均長（図 11J）が有意に減少し、樹状突起の密度は有意に増加していた（図 11G と 11H）。一方、突起の末端数（図 11F）と各次数の枝の平均の数（図 11I）には違いは見られなかった。これらの結果は飢餓時の野生型ニューロンで見られたものとよく似ており（図 7）、以後この表現型を「ミニチュア表現型」と呼称する。

欠失系統を用いた相補試験と、次世代シーケンサを用いた全ゲノム解析を組み合わせたマッピングを行ったところ、植物からヒトまで保存された遺伝子 *CHORD/morgana* にフレームシフトを引き起こす 1 塩基の欠失を同定した（図 12; 詳細は材料と方法を参照）。*CHORD* 遺伝子を含む 4754bp のゲノム領域の導入によって、樹状突起のサイズ、総突起長、そして樹状突起の密度が完全にレスキューされたことから、*CHORD* 遺伝子がミニチュア表現型の原因遺伝子であることが明らかとなった（図 11）。以後この変異体を *CHORD*² と呼称する。

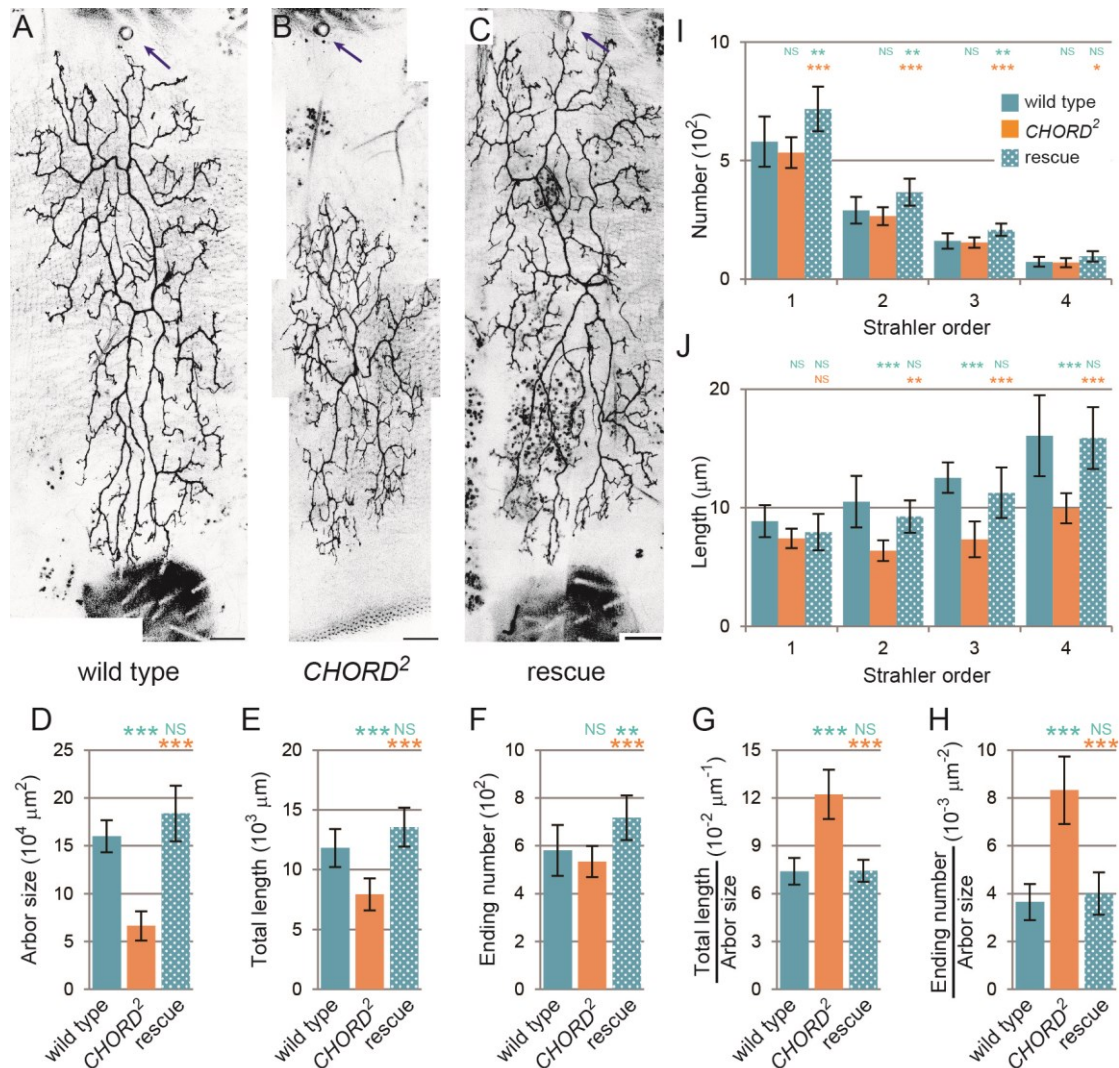


図 11. *CHORD* 変異ニューロンはミニチュア型の樹状突起を形成する

(A-C) 野生型ニューロン (A)、*CHORD* 変異ニューロン (B)、*CHORD* を含むゲノム領域を導入した *CHORD* 変異ニューロン (C)、の観察像。矢印は気門を示す。スケールバーは $50 \mu\text{m}$ 。(D-J) 各条件下での樹状突起パターンの定量データ。樹状突起のサイズ (D)、樹状突起長 (E)、末端数 (F)、樹状突起の密度 (G と H)、各次数のセグメントの平均数 (I) と平均長 (J) を定量化した。データは平均値±標準偏差で示した。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ (one-way ANOVA with Tukey's HSD post hoc test)。青字は野生型との、橙字は *CHORD* 変異ニューロンとの間で比較した値を示している。NS は統計的に有意差がないこと ($p > 0.05$) を示している。

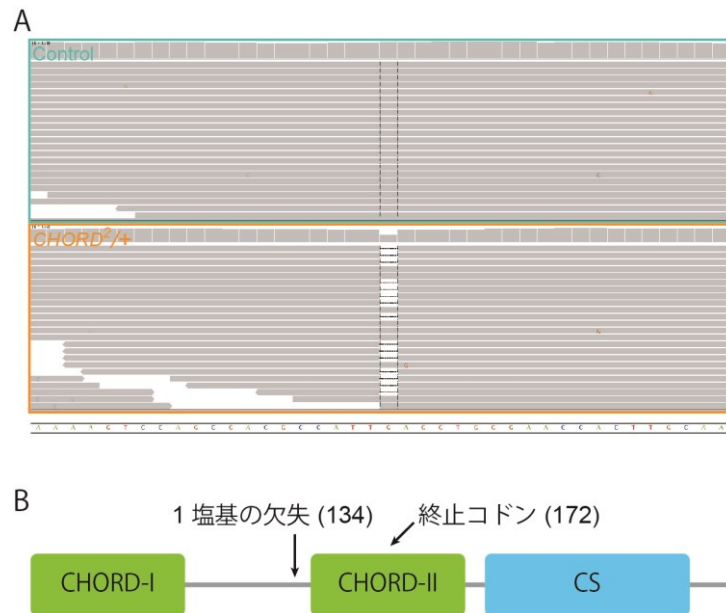


図 12. 全ゲノム解析による変異の同定

(A) 全ゲノム解析によって同定した 1 塩基の欠失。(B) CHORD の分子構造と変異の挿入箇所。CHORD は 2 つの cysteine-and histidine-rich (CHORD) ドメインと conserved in CHORD-containing protein and SGT1 (CS) ドメインを持っている。今回分離した変異体では 2 つめの CHORD ドメインの直前からフレームシフトを起こし、172 番目のアミノ酸が終止コドンになっている。

3.2. *CHORD* 変異ニューロンは体のサイズに関わらずミニチュア型の樹状突起を形成する

CHORD 変異ニューロンの表現型の解釈として、体のサイズに全く応答できなくなっている可能性と、体のサイズに誤って（例えば常に本来なるべきサイズの 50% のサイズに）スケーリングしている可能性が考えられる。これらを区別するために、飢餓条件での *CHORD* 変異ニューロンの樹状突起パターンを調べた（図 13）。樹状突起のサイズ、全長、末端数、密度、そして各次数の枝の平均数と平均長のいずれのパラメータも通常の栄養条件と飢餓条件の間で差はなかった。この結果は前者の可能性を支持している。従って、野生型のニューロン

は、体のサイズや栄養条件といった細胞外環境に応答して、CHORD 依存的に樹状突起サイズを調節していることが示唆された。

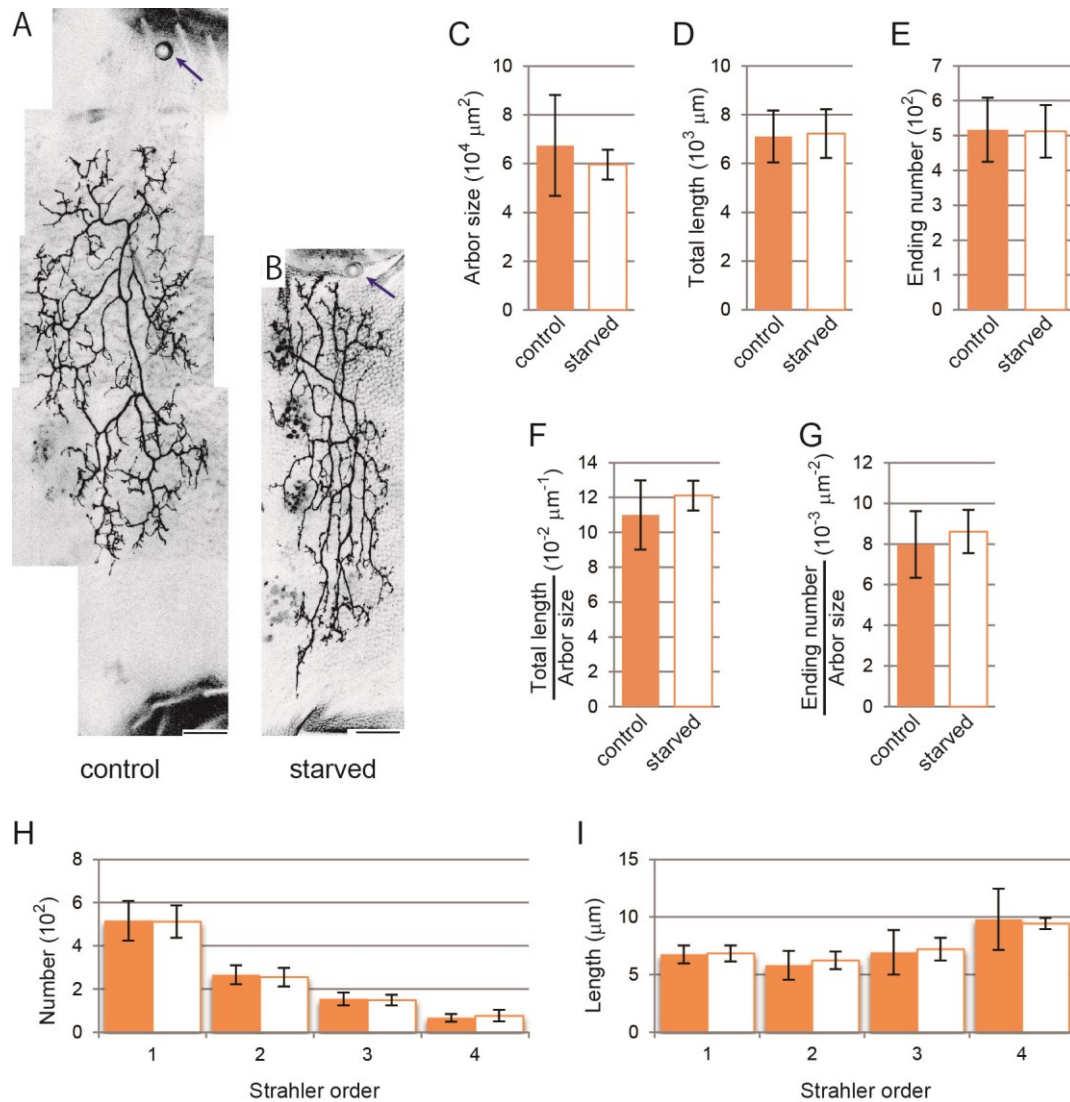


図 13. *CHORD* 変異ニューロンは体のサイズの変化に応答できない

(A と B) コントロール (A) または飢餓条件下 (B) での *CHORD* 変異ニューロンの観察像。矢印は気門を示す。スケールバーは $50 \mu\text{m}$ 。(C-I) 各条件下での樹状突起パターンの定量データ。樹状突起のサイズ (C)、樹状突起長 (D)、末端数 (E)、樹状突起の密度 (F と G)、各次数のセグメントの平均数 (H) と平均長 (I) を定量化した。データは平均値 \pm 標準偏差で示した。いずれの値も 2 条件の間で差はなかった (Student's t-test)。

3.3. 樹状突起のサイズ制御への HSP90 の関与の検証

CHORD は植物からヒトまで保存されているタンパク質であり、分子シャペロンである HSP90 の機能を調節するコシャペロン（シャペロン補助因子）として働くと考えられている (Ferretti et al., 2011; Kadota et al., 2010)。コシャペロンは、HSP90 の活性や折りたたみを助けるタンパク質（クライアント）の特異性に影響を与えることで、HSP90 の多様な機能を支えている (Taipale et al., 2010)。そこで、CHORD が HSP90 の機能を調節することで樹状突起のサイズを制御している可能性を検証するために、HSP90 の機能喪失が樹状突起サイズに与える影響を調べた。

まず、HSP90 の関与を検証するために、*hsp90* のノックダウン実験を行った。幼虫期からノックダウンを行うとニューロンが死んでしまい、樹状突起サイズに与える影響を明らかにすることはできなかった。そこで、TARGET system (McGuire et al., 2003) を用いて蛹期特異的に *hsp90* をノックダウンしたところ、樹状突起サイズが顕著に縮小し、樹状突起密度が上昇しているように見えた (図 14B)。また、HSP90 の阻害剤である 17-DMAP-GA を蛹に投与したところ、一部の個体において樹状突起サイズの減少と突起同士が絡まるような異常が見られた (図 14C と D)。以上の結果から、CHORD は HSP90 と共に樹状突起のサイズを制御している可能性が示唆された。

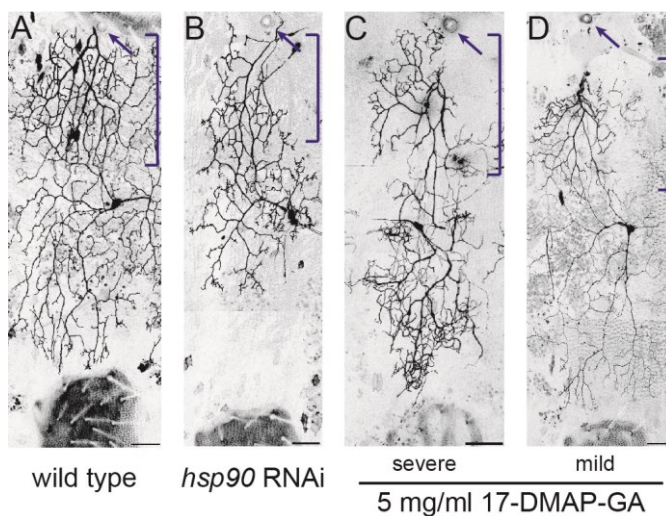


図 14. HSP90 の抑制は樹状突起サイズを減少させる

(A-D) 野生型ニューロン (A)、*hsp90* ノックダウンニューロン (B)、HSP90 阻害剤である 17-DMAP-GA を投与したニューロン (C と D) の観察像。矢印は気門を示す。IdaA/IdaA-like ニューロンの樹状突起 (括弧で示した) もラベルされている。スケールバーは 50 μ m。

3.4. CHORD と Rho-kinase の遺伝学的相互作用の検証

では、CHORD と HSP90 のクライアントは何なのだろうか。CHORD は植物からヒトまで広く保存されている。植物ホモログである RAR1 は、自然免疫応答に重要な NLR タンパク質 (nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat containing proteins) を安定化することが報告されている (図 15A) (Kadota et al., 2010; Shirasu et al., 1999)。しかしながら、ショウジョウバエには NLR タンパク質のホモログが存在しないため (Wilmanski et al., 2008)、樹状突起のスケーリングには別のクライアントが存在することが期待される。哺乳類の培養細胞においては、CHORD は Rho-kinase II の活性を抑制することで中心体の過剰な複製を防いでいることが知られている (図 15B) (Ferretti et al., 2010; Ferretti et al., 2011)。Rho-kinase は神経突起の伸長を負に制御することが知られているため (Amano et al., 2010)、「CHORD 変異ニューロンで見られる異常は、Rho-kinase (Rok) が異常に活性化しているために生じている」という仮説の検証を試みた。

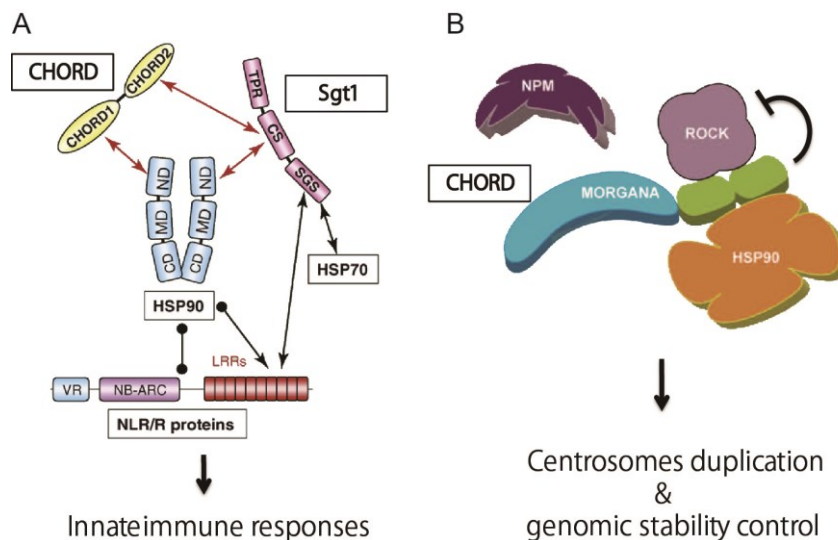


図 15. 報告されている CHORD ホモログの機能

(A) 植物における CHORD の機能。CHORD は他のコシャペロンである Sgt1 と HSP90 と三者複合体を作り、NLR タンパク質の安定化を介して自然免疫応答を制御している。(B) マウスとヒトにおける CHORD の機能。CHORD は Rho-kinase II と結合し、その活性を抑制することで中心体の過剰な分裂を防いでいる。(A)は Kadota et al., 2010 を、(B)は Ferretti et al., 2011 を元にそれぞれ改変。

まず、常時活性化型の Rok を v'ada ニューロンで過剰発現し、樹状突起パターンに与える影響を調べた (図 16)。常時活性化型の Rok の過剰発現によって、樹状突起のサイズ (図 16C) と樹状突起長 (図 16D) は有意に減少したのに対して、樹状突起の末端数と密度には有意な差はなかった (図 16E-G)。さらに、Strahler

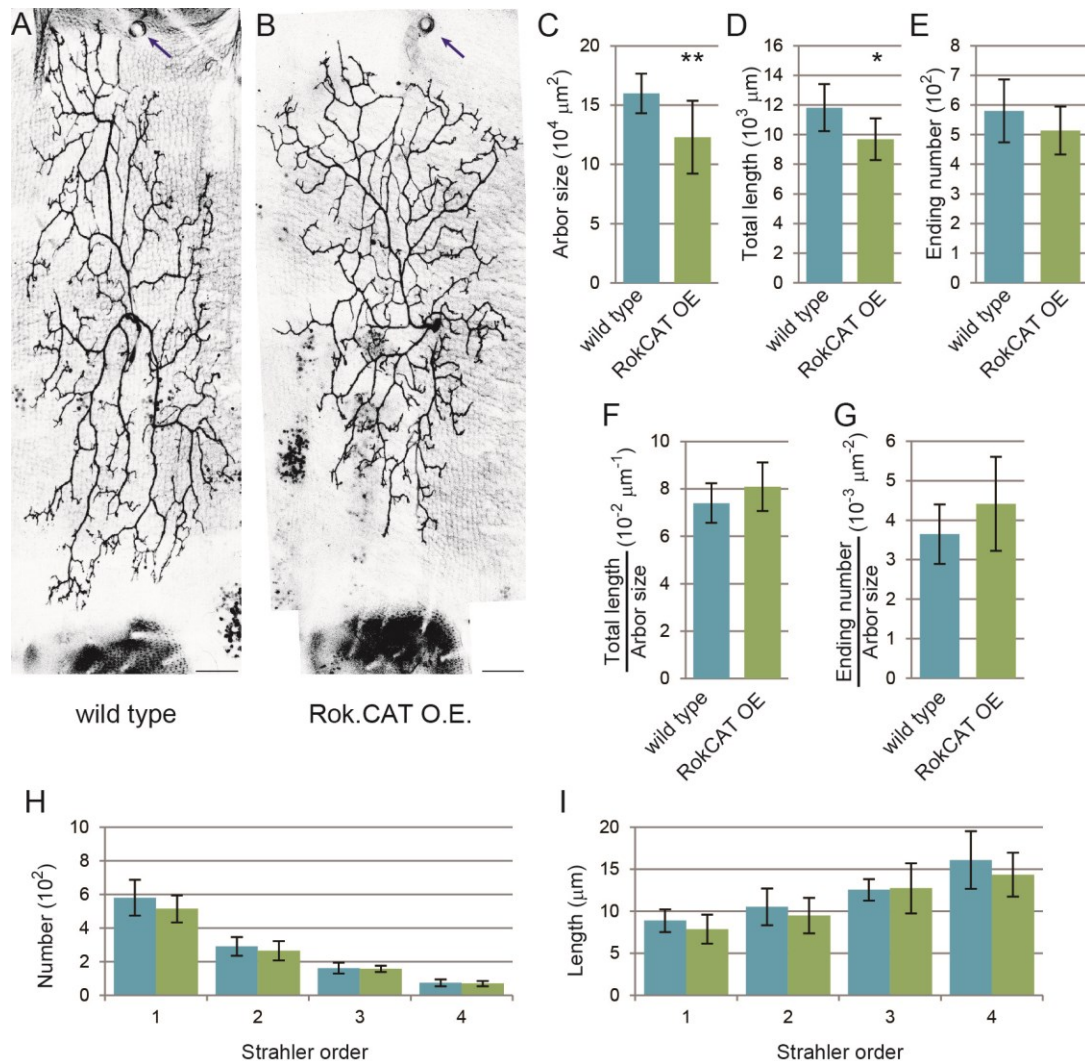


図 16. 常時活性化型の Rok の過剰発現ニューロンの樹状突起パターン

(A と B) 野生型ニューロン (A)、常時活性化型の Rok (Rok.CAT) 過剰発現ニューロン (B) の観察像。スケールバーは 50 μm 。(C-I) 樹状突起パターンの定量データ。樹状突起のサイズ (C)、樹状突起長 (D)、末端数 (E)、樹状突起の密度 (F と G)、各次数のセグメントの平均数 (H) と平均長 (I) を定量化した。データは平均値±標準偏差で示した。*p < 0.05、**p < 0.01 (Student's t-test)。

の解析も行ったところ、各次数の枝の数と平均長のいずれも変化はなかった（図 16H と I）。従って、常時活性化型の Rok の過剰発現は *CHORD* 変異ニューロンのようなミニチュア表現型は示さなかったと結論付けた。以上の結果は、

「*CHORD* 変異ニューロンで見られる異常は、Rho-kinase (Rok) が異常に活性化しているために生じている」という仮説に反するものである。しかしながら、常時活性化型の Rok の効果が不十分であった可能性も考えられるため、引き続き Rok の関与の検証を行うこととした。上記の仮説が正しければ、*CHORD* 変異ニューロンのミニチュア表現型は、Rok の抑制によってレスキューされることが期待される。そこで以下では、様々な方法で Rok の機能を抑制し、*CHORD* 変異ニューロンもしくは *CHORD* をノックダウンしたニューロンの表現型が回復するかを検討した。

まず、*CHORD* と *rok* の両方を同時にノックダウンしたが、*CHORD* を単独でノックダウンした場合と比べて、顕著な変化は見られなかった（図 17C-F）。また、*rok* 変異ニューロン内で *CHORD* をノックダウンした場合にも顕著な回復は見られなかった（図 17G）。さらに、*CHORD* 変異ニューロンで *rok* をノックダウンした場合や、Rok の阻害剤である Y-27632 を投与した場合においても、*CHORD* 変異ニューロンの表現型が回復することはなかった（図 17H-L）。

最後に、ショウジョウバエの培養細胞である S2 細胞で *CHORD* 遺伝子をノックダウンし、Rok の活性に変化があるかを調べた。Rok の活性の指標として、Rok の基質である Spaghetti squash (Sqh: 非筋ミオシン制御軽鎖) のリン酸化レベルを検証した。その結果、*CHORD* 遺伝子をノックダウンした細胞においてリン酸化 Sqh のレベルに顕著な変化は見られなかった（図 17M）。以上の全ての結果から、*CHORD* による樹状突起サイズの制御に、Rok は関与していないことが示唆された。

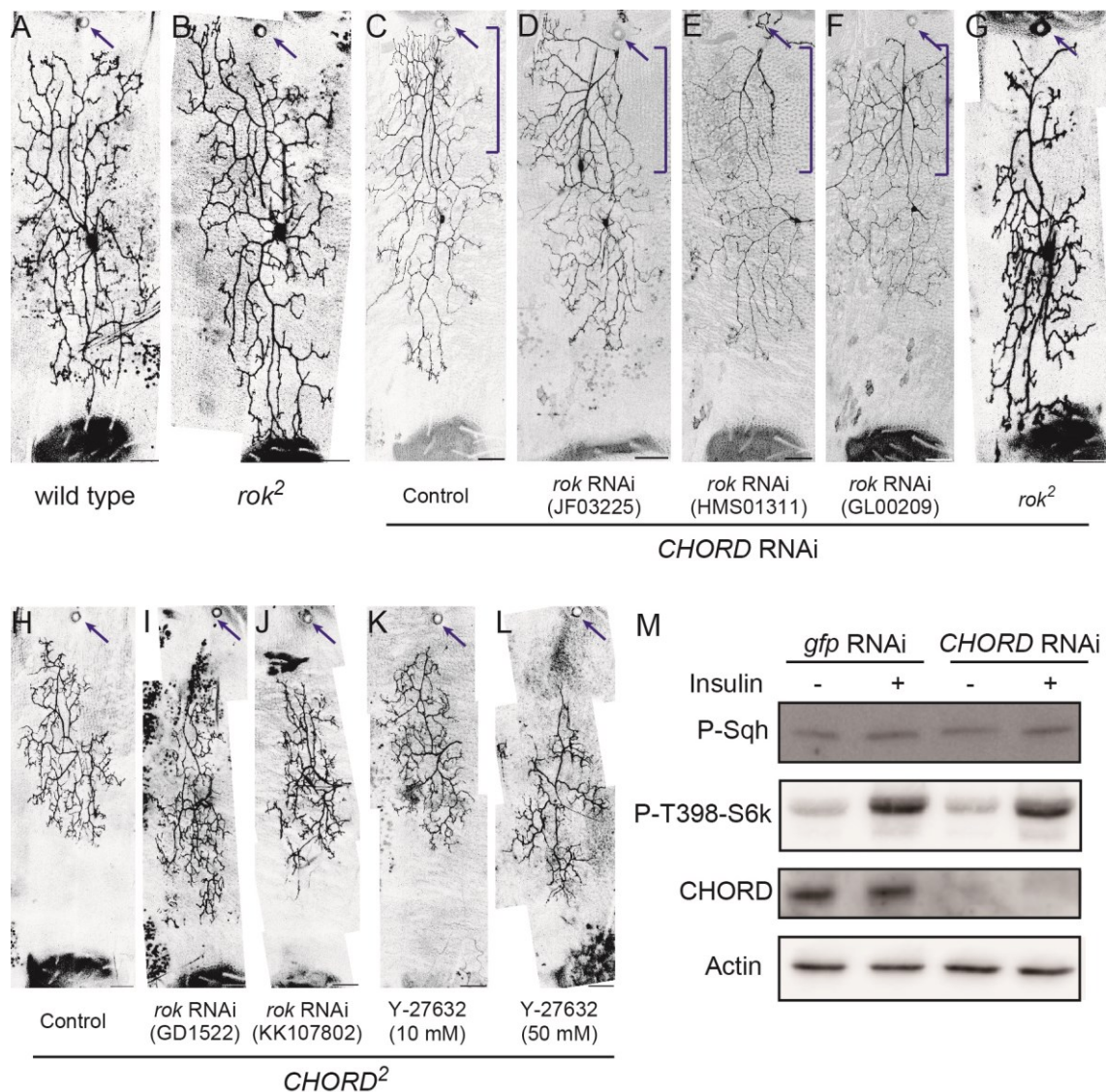


図 17. CHORD と Rok の相互作用の検証

(A-L) 野生型ニューロン (A)、*rok* 変異ニューロン (B)、*CHORD* ノックダウンニューロン (C)、*CHORD* と *rok* のダブルノックダウンニューロン (D-F)、*CHORD* をノックダウンした *rok* 変異ニューロン (G)、*CHORD* 変異ニューロン (H)、*rok* をノックダウンした *CHORD* 変異ニューロン (I と J)、Rok 阻害剤である Y-27632 を投与した *CHORD* 変異ニューロン (K と L) の観察像。(M) Rok の基質である Sph のリン酸化レベルの検証。 *gfp* または *CHORD* をノックダウンした S2 細胞の細胞破碎液を調製し、抗リン酸化 Sph 抗体、抗リン酸化 S6k 抗体、抗 *CHORD* 抗体、抗 Actin 抗体でブロットした。

3.5. CHORD は TORC2 の下流として機能する

私は、CHORD が関与するシグナル伝達経路の候補として、TOR が形成するもう一つの複合体である TORC2 に注目した。TORC2 の機能は TORC1 と異なり、protein kinase C (PKC) や Rho family GTPase の活性を調節し、アクチン骨格系を制御していると考えられている (図 18) (Laplante and Sabatini, 2012; Oh and Jacinto, 2011; Zinzalla et al., 2011)。アクチン骨格系の制御は樹状突起の伸長や分岐に重要であるため、v'ada ニューロンの樹状突起のサイズの制御に TORC2 が関わっている可能性が考えられる。実際、マウスの小脳プルキンエ細胞や幼虫期の da neuron において、TORC2 の機能喪失は樹状突起パターンの異常を示すことが報告されている (Koike-Kumagai et al., 2009; Thomanetz et al., 2013)。TORC2 の活性を制御する上流のシグナルについては未だ不明な点が多いものの、細胞外からの成長因子と細胞内のリボソームの両方が活性化に必要であることが示されており、TORC2 は細胞外環境と細胞の潜在的な成長能力の両方の情報を統

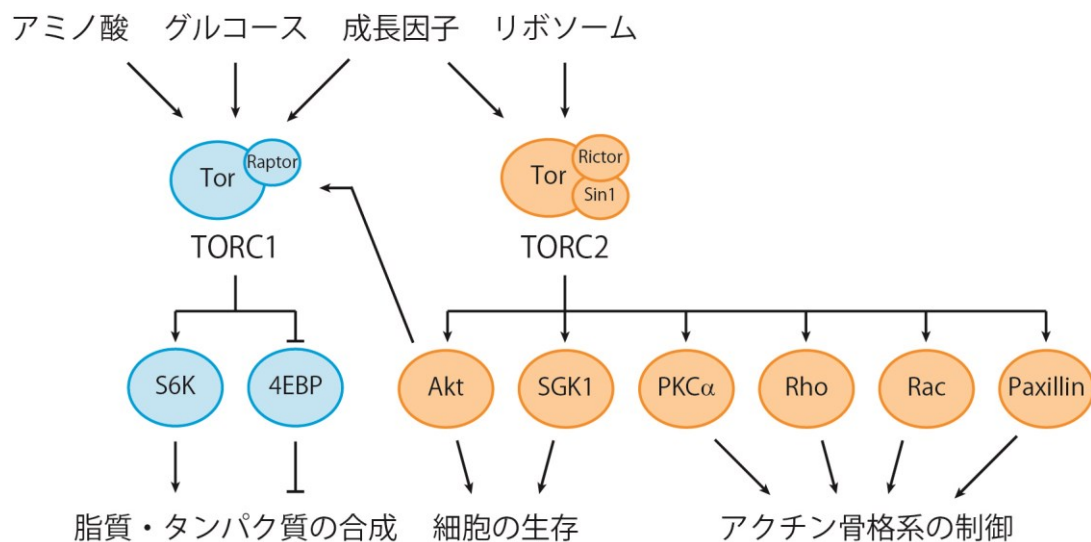


図 18. TORC1 と TORC2 の役割

TORC1 はアミノ酸や ATP レベル、成長因子などに応答して同化反応を促進すると共に異化反応を抑制する (図 2 も参照)。一方で TORC2 は、リボソームとの結合依存的に成長因子に応答して、細胞の生存やアクチン骨格系の制御を行う。また、TORC2 は Akt の活性化を介して TORC1 を活性化する。

合し、細胞成長を適切なレベルに調整している可能性が指摘されている (Zinzalla et al., 2011)。

そこで TORC2 に必須かつ特異的な構成因子をコードする *rapamycin-insensitive companion of TOR (rictor)* の変異ニューロンの表現型を検証した (図 19)。 *rictor* 変異ニューロンでは、樹状突起サイズ、樹状突起長、末端数、そして各次数のセグメント数が減少していた (図 19D-F、I)。この結果は IIS/TOR シグナル伝達経路の変異体とよく似ており、成長不全表現型の特徴である。一方で *rictor* 変異ニューロンでは、樹状突起密度の増加とセグメント長の減少を示した (図 19G と H、J)。この結果は飢餓条件での野生型ニューロンや *CHORD* 変異体と似た、ミニチュア表現型の特徴である。従って、*rictor* 変異ニューロンは成長不全型とミニチュア型の両方の特徴を併せ持っていると言える。

次に、Rictor と CHORD の遺伝学的相互作用を検証した。 *rictor* 変異ニューロンで *CHORD* トランスジーンを過剰発現すると、樹状突起の密度やセグメント長が部分的にレスキューされたのに対して、末端数や各次数のセグメントの数には変化はなかった (図 19D-J)。つまり、*CHORD* トランスジーンの過剰発現は、*rictor* 変異ニューロンのミニチュア表現型のみをレスキューしたと言える。以上の結果から、CHORD は TORC2 の下流において、樹状突起のセグメント長を調節することで樹状突起サイズを制御している可能性が示唆された。

さらに、体のサイズを小さくするために用いた飢餓の条件で、TORC2 の活性が変動するのかを調べた。91-96 hr AEL の幼虫を 8 時間飢餓条件に晒し、TORC2 の活性の指標である 505 番目のセリンのリン酸化レベルを検証した結果、コントロールと比べて有意に減少していた (図 20A と B)。以上の結果から、TORC2 は飢餓条件もしくは体のサイズの変化を感知し、CHORD を介して樹状突起サイズを調節している可能性が示唆された。

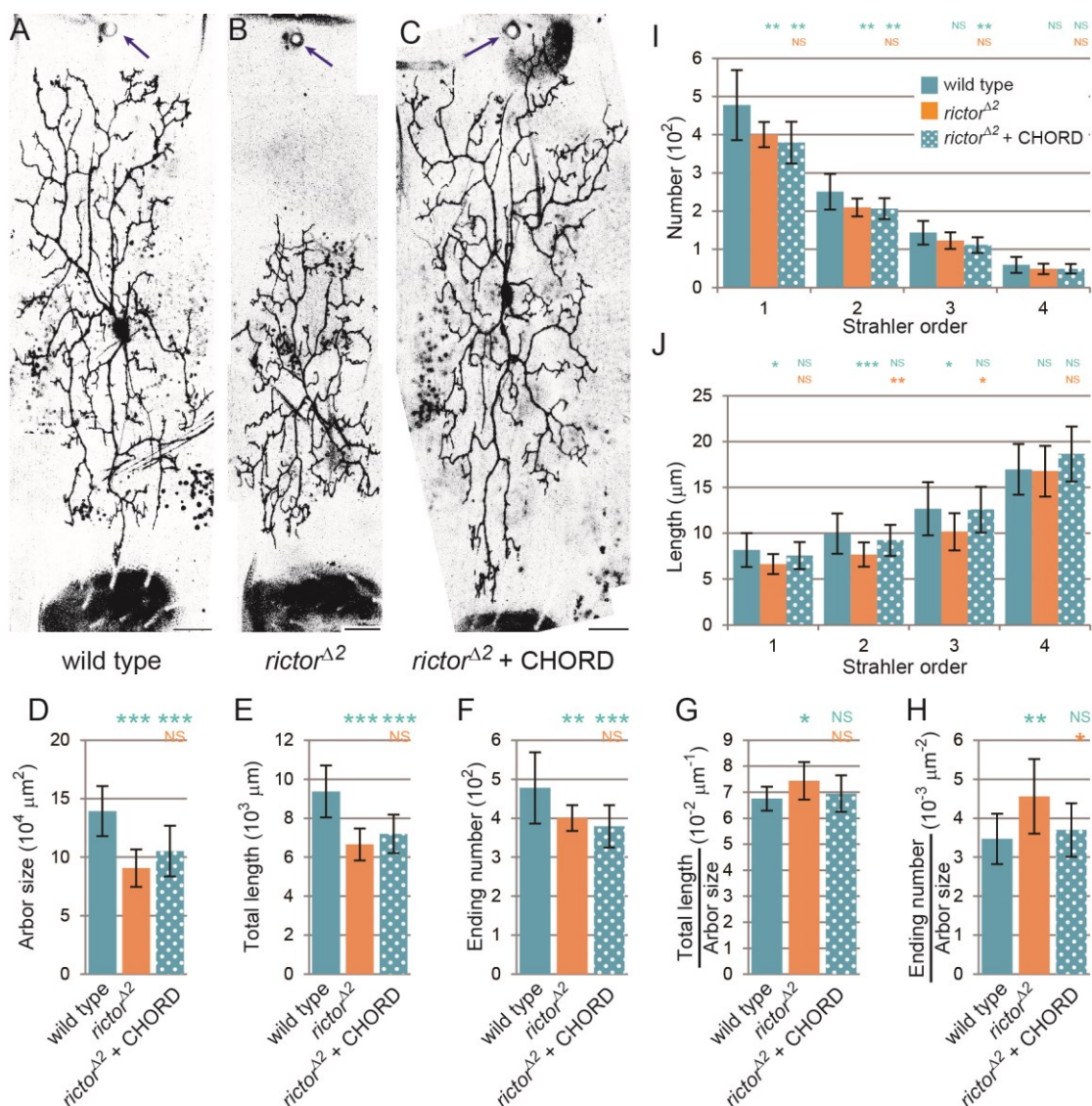


図 19. CHORD と TORC2 の遺伝学的相互作用の検証

(A-C) 野生型ニューロン (A)、*rictor* 変異ニューロン (B)、*CHORD* を過剰発現した *rictor* 変異ニューロン (C)、の観察像。矢印は気門を示す。スケールバーは 50 μm。 (D-J) 各条件下での樹状突起パターンの定量データ。樹状突起のサイズ (D)、樹状突起長 (E)、末端数 (F)、樹状突起の密度 (G と H)、各次数のセグメントの平均数 (I) と平均長 (J) を定量化した。データは平均値±標準偏差で示した。**p* < 0.05、***p* < 0.01、****p* < 0.001 (one-way ANOVA with Tukey's HSD post hoc test)。青字は野生型との、橙字は *rictor* 変異ニューロンとの間で比較した値を示している。NS は統計的に有意差がないこと (*p* > 0.05) を示している。*rictor* 変異ニューロンは成長不全表現型とミニチュア表現型の両方の特徴を示した。*CHORD* の過剰発現によってミニチュア型の特徴のみがレスキューされた (詳細は本文参照)。

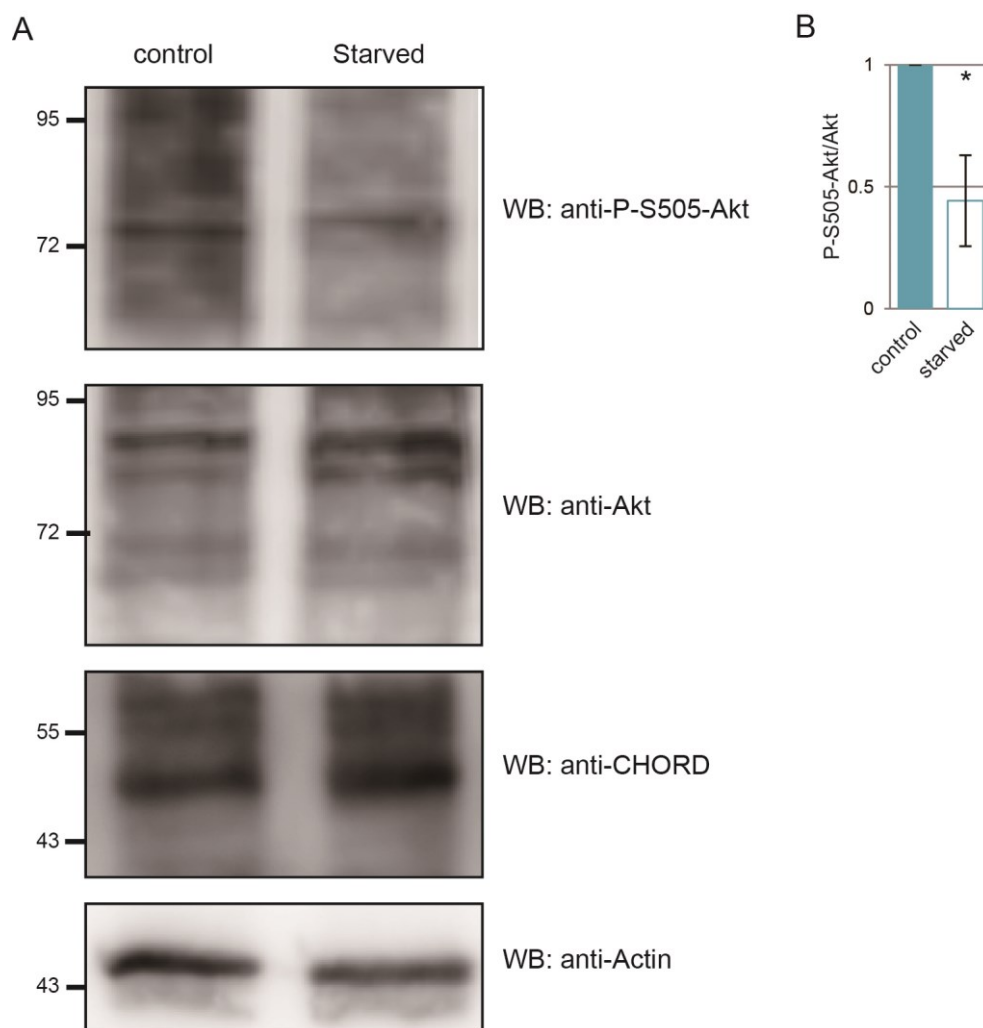


図 20. 飢餓条件下の個体での TORC2 活性の検証

(A) TORC2 の基質である Akt のリン酸化レベルの検証。91~97 hr AEL の幼虫を回収し、エサあり (control) またはエサなし (starved) の環境で 8 時間飼育した後、細胞破碎液を調製した。細胞破碎液は、抗リン酸化 Akt 抗体、抗 Akt 抗体、抗 CHORD 抗体、抗 Actin 抗体でブロットした。(B) Akt レベルで補正したリン酸化 Akt レベルの定量化。リン酸化 Akt レベルを Akt レベルで補正し、コントロールの値を 1 としたときの比を計算した。実験は 3 回行った。データは平均値±標準偏差で示した。* $p < 0.05$ (Student's t-test)。

3.6. 伸長・退縮の速度の違いによってミニチュア表現型を説明できる

次に私は、樹状突起のパターン形成にどのような変化が生じた結果、ミニチュア型の樹状突起パターンが形成されるのかを明らかにするために、樹状突起形成のダイナミクスを検証した。まず、発生の各ステージにおいて、野生型と *CHORD* 変異ニューロンの樹状突起パターンを比較した (図 21)。序論で述べたように、*v'ada* ニューロンは蛹期において幼虫型の樹状突起を除去し、新たに成虫型の樹状突起を再伸長する。*CHORD* 変異ニューロンは、幼虫期の樹状突起形成 (図 21A と B) や蛹期の樹状突起の除去 (図 21C と D) には異常は見られなかった。一方、樹状突起の再伸長時には、*CHORD* 変異ニューロンの樹状突起パターンは常に野生型のミニチュア型であった (図 21E-H)。従って、野生型ニュー

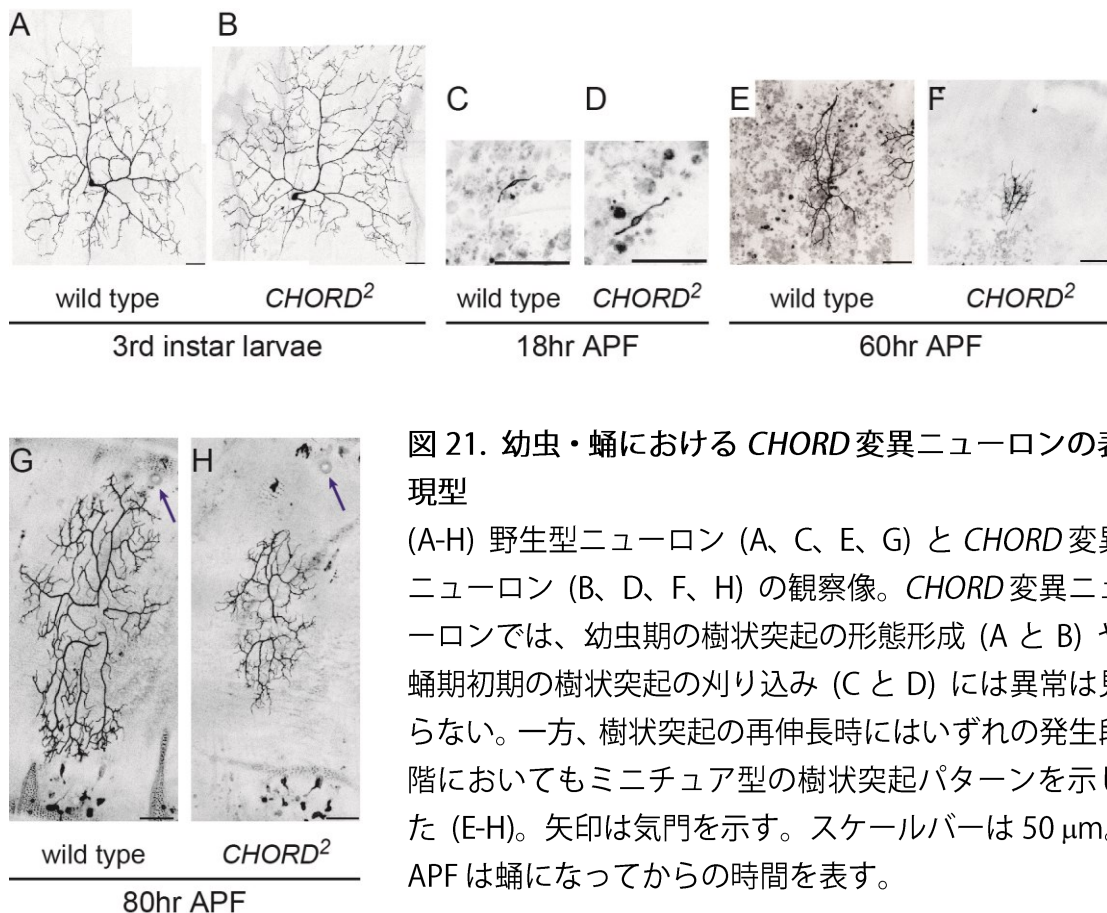


図 21. 幼虫・蛹における *CHORD* 変異ニューロンの表現型

(A-H) 野生型ニューロン (A、C、E、G) と *CHORD* 変異ニューロン (B、D、F、H) の観察像。*CHORD* 変異ニューロンでは、幼虫期の樹状突起の形態形成 (A と B) や蛹期初期の樹状突起の刈り込み (C と D) には異常は見られない。一方、樹状突起の再伸長時にはいずれの発生段階においてもミニチュア型の樹状突起パターンを示した (E-H)。矢印は気門を示す。スケールバーは 50 μm。APF は蛹になってからの時間を表す。

ーロンと *CHORD* 変異ニューロンの間には、伸長、退縮、分岐といった再伸長時の樹状突起ダイナミクスに何らかの違いがある可能性が示唆された。

そこで次に、樹状突起が精力的に形成される時期である蛹化後 70-75 時間 (70-75 hr APF) においてタイムラプス観察を行い、樹状突起ダイナミクスを定量化した (図 22)。まず、末端のセグメントが伸長もしくは退縮する割合を定量化したところ、野生型と *CHORD* 変異ニューロンの間に違いは見られなかった (図 22A と B)。また、樹状突起のダイナミクスの指標として用いられる fano factor (図 22C; 材料と方法も参照) や分岐の頻度 (図 22D) にも両者で違いはなかった。一方、単位時間当たりの先端のセグメント長の変化率 (突起の伸長・退縮の速度) は、*CHORD* 変異ニューロンにおいて有意に減少していた (図 22E)。従って、*CHORD* 変異ニューロンでは、樹状突起のダイナミクスの様式そのものには異常はなく、先端のセグメントの変化の絶対値が減少したため、野生型の縮小型の樹状突起パターンを形成したことが示唆された。

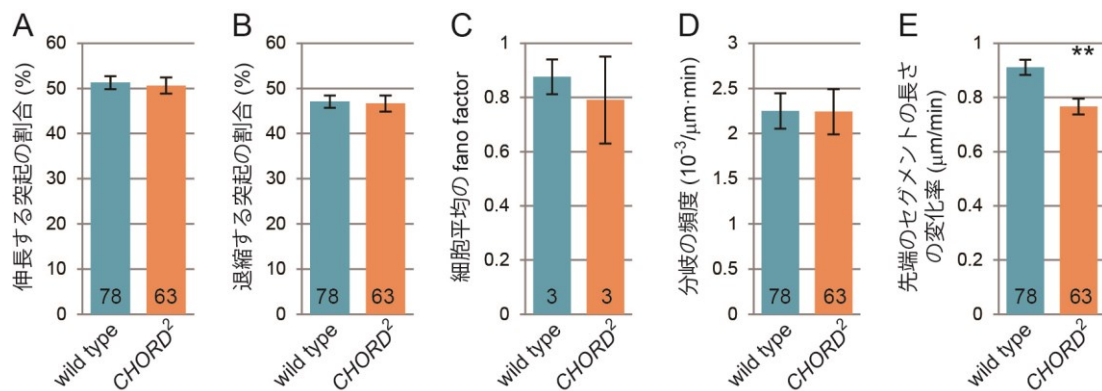


図 22. *CHORD* 変異ニューロンの樹状突起ダイナミクス

(A-E) 野生型または *CHORD* 変異ニューロンの樹状突起ダイナミクスの定量データ。伸長または退縮する突起の割合 (A と B) や細胞平均の fano factor (C)、そして分岐頻度 (D) には差はなかった。一方、先端のセグメント長の変化率 (突起の伸長・退縮の速度; E) は *CHORD* 変異ニューロンで有意に減少していた。データは平均値±標準誤差で示した。グラフ上の数字は解析したサンプル数を示している。**p < 0.01 (one-way ANOVA with Tukey's HSD post hoc test)。有意差の検定は図 22、23、26 のデータを併せて行った。

さらに、成長不全表現型を示すインスリン受容体変異ニューロン（図 8C）についても樹状突起ダイナミクスの定量化を行った。その結果、インスリン受容体変異ニューロンでは先端のセグメント長の変化率だけでなく、分岐の頻度も有意に減少していた。その他のパラメータについては野生型との間に有意な差は見られなかった（図 23）。つまり、インスリン受容体変異ニューロンでは伸長と分岐の両方が、*CHORD* 変異ニューロンでは突起の伸長のみが低下していることが明らかとなった。

これらの結果は、成長不全表現型では樹状突起長と末端数の両方が、ミニチュア表現型では樹状突起長のみが減少していることと直感的には一致する。しかしながら、本当に観測されたダイナミクスの変化によって最終的な表現型を説明できるのかは分からない。そこで、定量データを元にしたコンピュータシミュレーションを行い、ミニチュア表現型を再現できるかどうかを調べた（図 24 と図 25; 詳細は材料と方法を参照）。*CHORD* 変異ニューロンのパラメータを用いた場合は、野生型のものを用いた場合に比べて、再現された樹状突起の大

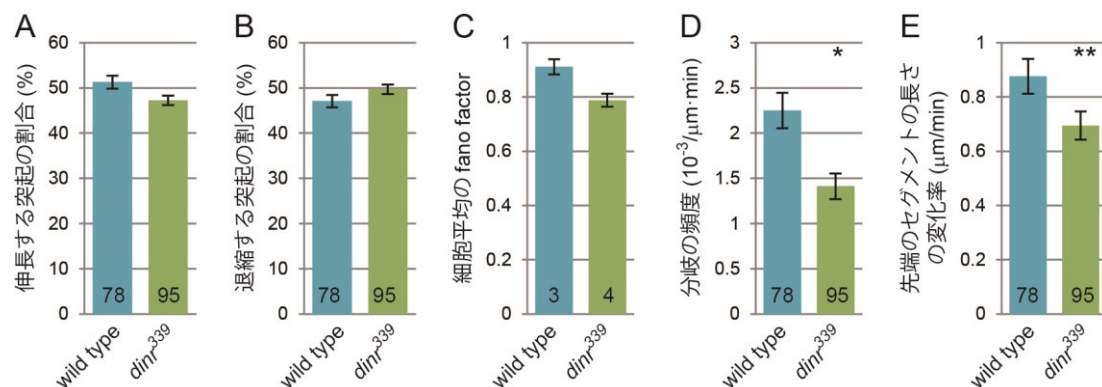


図 23. インスリン受容体変異ニューロンの樹状突起ダイナミクス

(A-E) 野生型またはインスリン受容体変異ニューロンの樹状突起ダイナミクスの定量データ。伸長また退縮する突起の割合 (A と B) や細胞平均の fano factor (C) には差はなかった。一方、インスリン受容体変異ニューロンでは、分岐の頻度 (D) と先端のセグメント長の変化率 (E) が有意に減少していた。データは平均±標準誤差で示した。グラフ上の数字は解析したサンプル数を示している。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ (one-way ANOVA with Tukey's HSD post hoc test)。

きさや樹状突起長が有意に減少したのに対して、樹状突起の末端数は変化しなかった(図 25A-C)。また、樹状突起の密度は有意に増加していた(図 25D と E)。この結果は、in vivo での *CHORD* 変異ニューロンの表現型に似ている。従って、先端セグメントの長さの変化率のみが僅かに小さいことが、ミニチュア型の樹状突起の形成に重要であることが示唆された。

最後に私は、野生型の飢餓条件においても *CHORD* 変異ニューロンと同様のダイナミクスの変化が見られるのかを調べた。飢餓条件では、通常の栄養条件に比べて先端のセグメントの長さの変化率が、有意ではないものの減少してい

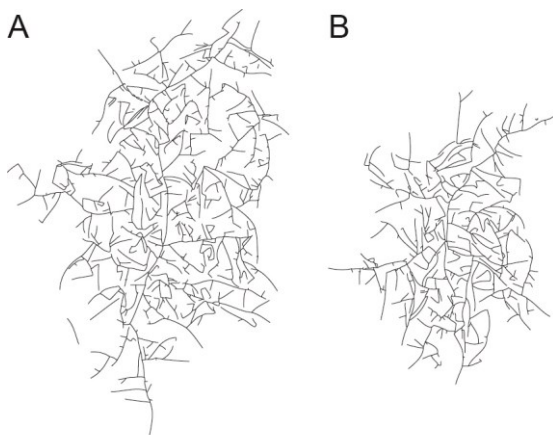


図 24. シミュレーションによって再現した樹状突起パターン

(A と B) 野生型ニューロン(A) または *CHORD* 変異ニューロン (B) のパラメータ (図 22) を用いて行ったシミュレーションによって得られた樹状突起パターン。

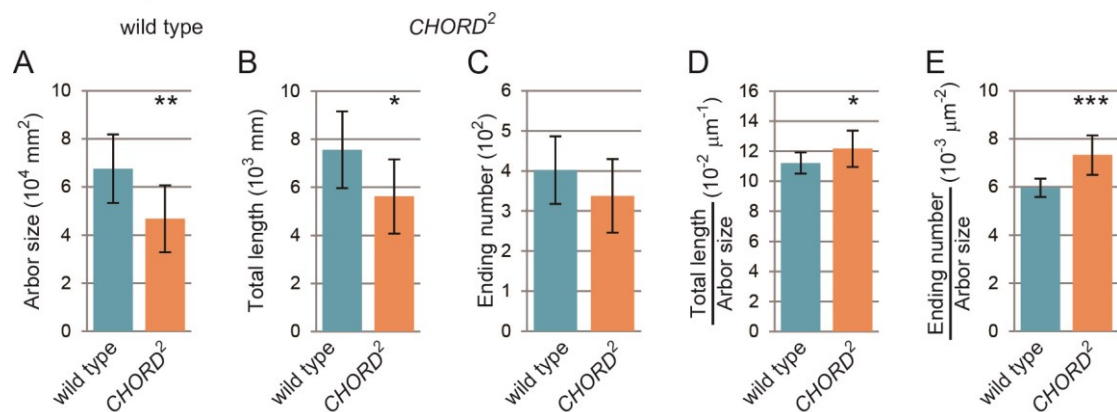


図 25. シミュレーションによって再現した樹状突起パターンの定量化

(A-E) 野生型ニューロンまたは *CHORD* 変異ニューロンのパラメータを用いて得られた樹状突起パターンの定量データ。樹状突起のサイズ (A)、樹状突起長 (B)、末端数 (C)、樹状突起の密度 (Dと E) を定量化した。データは平均値±標準誤差で示した。**p* < 0.05、***p* < 0.01、****p* < 0.001 (Student's *t*-test)。

る傾向にあった (図 26E; $p=0.069$)。その他のパラメータについては通常の栄養条件と差はなかった (図 26A-D; $p>0.65$)。この結果は *CHORD* 変異ニューロンのものと似ており、CHORD が突起の伸長や退縮の速度を調節することで樹状突起のスケールに寄与しているという仮説を支持している。

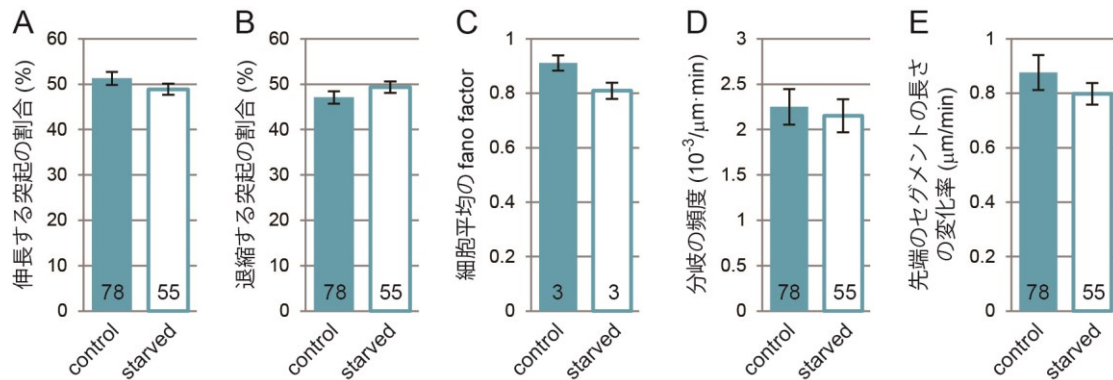


図 26. 飢餓条件下での樹状突起ダイナミクス

(A-E) コントロールまたは飢餓条件下での樹状突起ダイナミクスの定量データ。伸長また退宿する突起の割合 (A と B)、細胞平均の fano factor (C)、分岐頻度 (D)、先端のセグメント長の変化率 (E) を定量化した。データは平均値±標準誤差で示した。グラフ上の数字は解析したサンプル数を示している。検定は one-way ANOVA with Tukey's HSD post hoc test を用いた。

第4章 考察

4.1. 樹状突起サイズの調節には異なる2つの様式が存在する

私は本研究において、樹状突起のサイズを小さくする方法には2つの異なる様式があることを明らかにした（図9）。ひとつは、樹状突起の伸長と分岐の両方を抑制する方法で、この場合樹状突起のサイズと分岐の数が減少する「成長不全型」の樹状突起パターンとなる。もうひとつは、樹状突起の分岐頻度は維持しながら伸長の速度のみを抑制する方法で、この場合、樹状突起サイズは小さいが分岐パターンは変わらない「ミニチュア型」の樹状突起を形成する。さらに本研究では、IIS/TORC1 シグナル経路伝達は樹状突起の伸長と分岐の両方を制御することで分岐数の変化を伴う樹状突起のサイズ制御を行っているのに対して、CHORD と TORC2 はセグメント長（分岐点間隔）を調整することで分岐パターンを保ったままでのサイズの制御を実現していることが明らかとなった（図27）。つまり、上記の2つのタイプの樹状突起サイズの制御には、異なるシグナル伝達経路が関与していることが示されたのである。

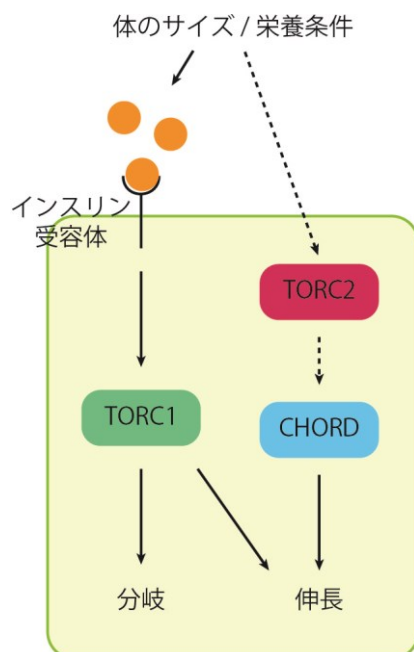


図27. 樹状突起サイズを制御する2つのシグナル伝達経路

本研究の結果から示唆された樹状突起サイズを制御する分子メカニズム。体のサイズや栄養条件といった細胞外の状態がTORC2を介してCHORDに伝えられ、CHORDは樹状突起の伸長を促進することでセグメント長を調節している。一方で、IIS/TORC1シグナル伝達経路は樹状突起の伸長と分岐の両方を制御している。

4.2. 樹状突起サイズの制御における CHORD の役割

CHORD ははじめ、植物において自然免疫応答に必要なタンパク質として同定され、その後の解析から HSP90 のコシャペロンとして機能していることが明らかとなった (Kadota et al., 2010; Shirasu et al., 1999)。また *CHORD* は、植物からヒトまで広く保存された遺伝子であり、近年動物における CHORD の機能についてもいくつか報告がなされている。Ferretti らは、*CHORD* の機能が減弱すると中心体が過剰に分裂してしまうことを発見し、結合分子の探索から CHORD は Rho-kinase の機能を阻害していることを見出した (Ferretti et al., 2010; Ferretti et al., 2011)。一方で、CHORD は神経細胞などの分裂を終えた細胞においても発現していることが報告されており、細胞分裂以外の現象にも関与している可能性が示唆されていた (Brancaccio et al., 2003)。本研究では、体のサイズに合わせた樹状突起のスケーリングに CHORD が重要な役割を果たしていることを明らかにした。

Rho-kinase は神経突起の伸展、樹状突起の分岐形成、スパインの形成を阻害することが知られている (Amano et al., 2010)。そこで、樹状突起サイズの制御においても Rho-kinase が CHORD の下流として機能している可能性を検討したが、CHORD と Rho-kinase の間に相互作用は見られなかった (図 17)。そこで私は CHORD 関連分子を様々な方法で探索し (補遺も参照)、CHORD が TORC2 を介したシグナル伝達経路に関与することを見出した (図 19 と 20)。しかしながら、具体的に CHORD が TORC2 シグナルにどのように関わっているのかについては、不明な点が多い。一つの仮説として、CHORD が TORC2 の基質を安定化している可能性があげられる。実際、TORC2 によるリン酸化は、Akt や conventional PKCs などの AGC キナーゼの安定性に重要であり、HSP90 はリン酸化されていない不安定な AGC キナーゼを分解から保護していることが報告されている (Facchinetti et al., 2008; Ikenoue et al., 2008)。従って、CHORD は HSP90 のコシャペロンとしての機能、あるいは自身のシャペロン活性 (Michowski et al., 2010) を

介して TORC2 の基質を安定化することで、間接的に TORC2 シグナルを増強しているのかもしれない。このような分子の候補として、最近 TORC2 の新たな基質であることが報告された Tricornered (Trc) がある。Trc は幼虫期の da neuron において、TORC2 の下流として樹状突起の交差忌避に関与することが報告されており (Koike-Kumagai et al., 2009)、同様のシグナル伝達経路が、成虫 da neuron の v'adan ニューロンにおける樹状突起サイズ制御にも関わっている可能性があるだろう。

4.3. 進化の過程で見られる樹状突起サイズのスケーリング

比較解剖学の分野では、様々な動物種における同じ種類のニューロンの形態の比較がなされてきた。こういった研究から、小脳プルキンエ細胞などの神経細胞では、体のサイズが大きい動物種ほど分岐が多く、大きなサイズの樹状突起を形成することが分かった (図 28A) (Defelipe, 2011; Wittenberg and Wang, 2007)。一方で、somatosensory thalamocortical projection neurons などの神経細胞では、樹状突起のサイズのみが変化し、分岐パターン自体はそれぞれの動物種で非常によく保存されている (図 28B) (Ohara and Havton, 1994; Teeter and Stevens, 2011)。

A 小脳のプルキンエ細胞



B 大脳皮質の錐体細胞



図 28. 進化の過程で見られる樹状突起サイズのスケーリング

様々な動物における、小脳のプルキンエ細胞 (A) と大脳皮質の錐体細胞 (B) の樹状突起形態。(A) は動物ごとにことなるスケールで表示している。Wittenberg and Wang, 2007 より改変。

これらの進化の過程でみられる樹状突起サイズのスケーリングの様式は、本研究で提唱した2種類の樹状突起サイズ調節様式に似ている。従って、IIS/TORC1 または TORC2/CHORD が進化の過程で起こる樹状突起サイズのスケーリングにも貢献しているかもしれない。

4.4. 幼虫期 da neuron の樹状突起のサイズ調節機構との比較

v'ada ニューロンを含むクラス IV da neuron は、幼虫の体のサイズの増大に合わせて樹状突起サイズが増大することが報告されている (Parrish et al., 2009; Sugimura et al., 2003)。この、樹状突起の「スケーリング的成長」では、分岐の数を増やししながら樹状突起サイズを増加させるもので、本研究で発見した成虫 v'ada ニューロンの樹状突起サイズのスケーリングとは異なっている。実際、幼虫期のスケーリング的成長には IIS/TORC1 シグナル伝達経路が重要であることが報告されているのに対して (Parrish et al., 2009)、CHORD は幼虫期の樹状突起サイズ制御には不要であり (図 21A と B)、成虫 v'ada ニューロンの樹状突起サイズ制御にのみ関与しているようだ。この樹状突起サイズのスケーリングの様式の違いは、幼虫と成虫での体のサイズの制御の違いを反映しているのかもしれない。幼虫期は餌を食べながら体のサイズを随時増大させるが、成虫の体のサイズは幼虫期に食べた餌の量で前もって決定されている。つまり、幼虫期の v'ada ニューロンは体のサイズがどこまで大きくなるかを知らないために、体のサイズが増大に合わせて新たに突起を追加していく戦略を取るのに対して、蛹期の v'ada ニューロンは最終的な体のサイズを前もって知っているため、分岐の間隔を調節することで分岐パターンは変えずに適切なサイズの樹状突起を形成することができるのではないだろうか。

4.5. da neuron が体のサイズを感知する機構

私は本研究の結果から、v'ada ニューロンは何らかの方法で体のサイズを感知

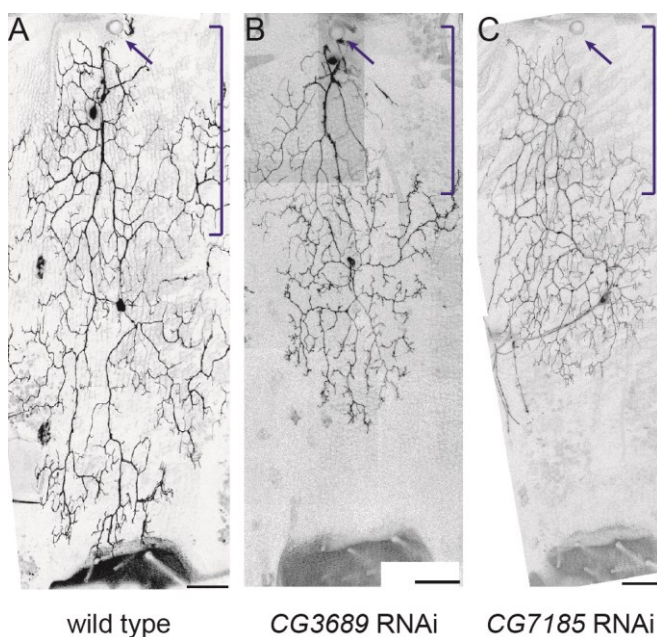
しているのではないかと想像している。このような仮想のシグナルの供給源として、グリア、表皮、そして腹部の筋肉 (lateral tergosternal muscles) といった v'ada ニューロンの隣接する組織や、脂肪体やインスリン産生細胞群といった全身の成長を制御している組織などが考えられる。従って、成虫 v'ada ニューロンは、神経細胞とほかの組織との相互作用を研究する有用なモデル系となることが期待される。

第5章 補遺

CHORD が樹状突起のスケーリングを調節する分子メカニズムを明らかにする目的で、生化学的あるいは遺伝学的なスクリーニングを行った。結果的には CHORD に関連のあるタンパク質を同定することはできなかったが、ネガティブな結果であっても報告することは重要だと考え、以下に結果と考察を記述する。

5.1. CHORD と相互作用が予測されている分子の解析

CHORD もしくは CHORD のホモログと相互作用することが報告されているタンパク質を候補として遺伝学的なスクリーニングを行った。具体的には、BioGRID、InterologFinder、DroID の 3 つのデータベースにおいて CHORD タンパク質と相互作用が予測されるタンパク質をリストアップし、それらをコードする遺伝子が樹状突起の形態に与える影響を調べた (補表 1)。その結果、CG3689 をノックダウンしたニューロンがミニチュア型の樹状突起パターンを示すことが明らかとなった (補図 1B)。CG3689 は mRNA の 3' 末端プロセッシング因子である Cleavage Factor Im (CFIm) の 25 kDa サブユニットをコードしている (Proudfoot, 2004)。CFIm の 59/68 kDa サブユニットをコードしている CG7185 の



補図 1. CFIm をノックダウンしたニューロンの観察像

(A-C) 野生型ニューロン (A)、CFIm の 25 kDa サブユニットをコードする CG3689 をノックダウンしたニューロン (B)、CFIm の 59/68kDa サブユニットをコードする CG7185 をノックダウンしたニューロン (C) の観察像。矢印は気門を示す。IdaA/IdaA-like ニューロンの樹状突起 (括弧で示した) もラベルされている。スケールバーは 50 μm 。

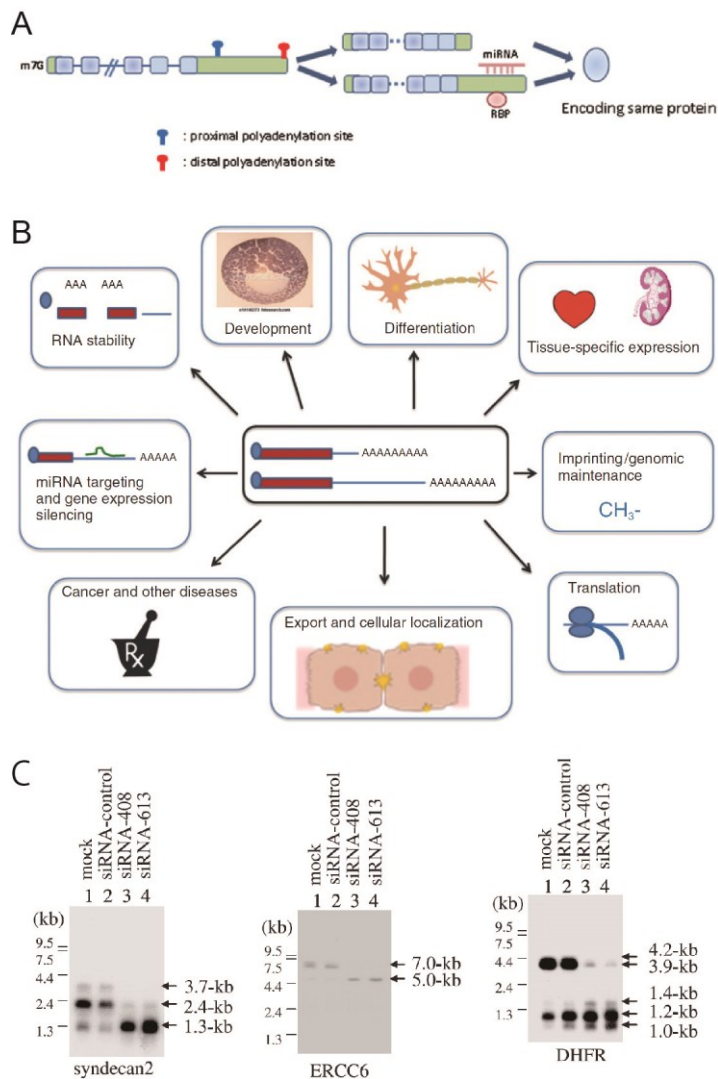
ノックダウンによっても同様の異常が見られた（補図 1C）ことから、CFIm が樹状突起サイズの制御に関わっている可能性が示唆された。

遺伝子名	分子に関する情報	行った実験	結果
		ノックダウン（HMS01365）	異常なし
<i>Rala</i>	Ras-like protein A	ドミナントネガティブ体（ <i>Rala</i> .S25N）過剰発現	異常なし
		変異体（ <i>Rala</i> [EE1]）	成長不全型
<i>CG5846</i>	機能未知	ノックダウン（KK105728）	異常なし
<i>CG7387</i>	熱ショック タンパク質	ノックダウン（KK103982）	異常なし
<i>hsp90</i>	熱ショック タンパク質	ノックダウン（KK101256）	細胞死
<i>CG3689</i>	Cleavage Factor Im 25kDa サブユニット（CFIm25）	ノックダウン（HMS00671）	ミニチュア型
<i>mys</i>	β -インテグリン	ヌル変異体の MARCM 解析（ <i>mys</i> [1]）	成長不全型 /異常なし
<i>PpD3</i>	Protein phosphatase 5 触媒サブユニット	未解析	—
<i>alc</i>	AMP-activated protein kinase (AMPK) ・サブユニット	ノックダウン（HMS00316）	異常なし
		ノックダウン（GL00029）	異常なし
<i>SNF1A</i>	AMPK α サブユニット	野生型（SNF1A.M）過剰発現	異常なし
		恒常的活性化型（SNF1A[T184D]）過剰発現	異常なし
		ドミナントネガティブ体（SNF1A[K57A]）過剰発現	異常なし
		RNAi（JF01951）	異常なし

補表 1. CHORD と相互作用が予測されている分子の一覧

BioGRID、InterologFinder、DroID の 3 つのデータベースにおいて CHORD タンパク質と相互作用が予測されるタンパク質をコードする遺伝子について、既知の機能と行った実験の内容と結果をまとめた。

真核生物の多くの遺伝子は、3'非翻訳領域（UTR）内に複数のポリ A サイトが存在することが存在する。どのポリ A サイトを使用するかは発生段階や組織ごとに異なっており、mRNA の代謝に影響を与えることで発生や病態などの様々な現象に関与することが示唆されている（補図 2A と B）(Di Giammartino et al., 2011; Lutz and Moreira, 2011)。CFIm はこのような「選択的ポリ A 付加」を制御する因子で、CFIm を減少させた細胞では最も 5'側のポリ A サイトが使用されるようになること、すなわち 3'-UTR が短くなることが報告されている（補図 2C）(Kubo et al., 2006)。そこで、CHORD が CFIm との相互作用を介して選択的ポリ

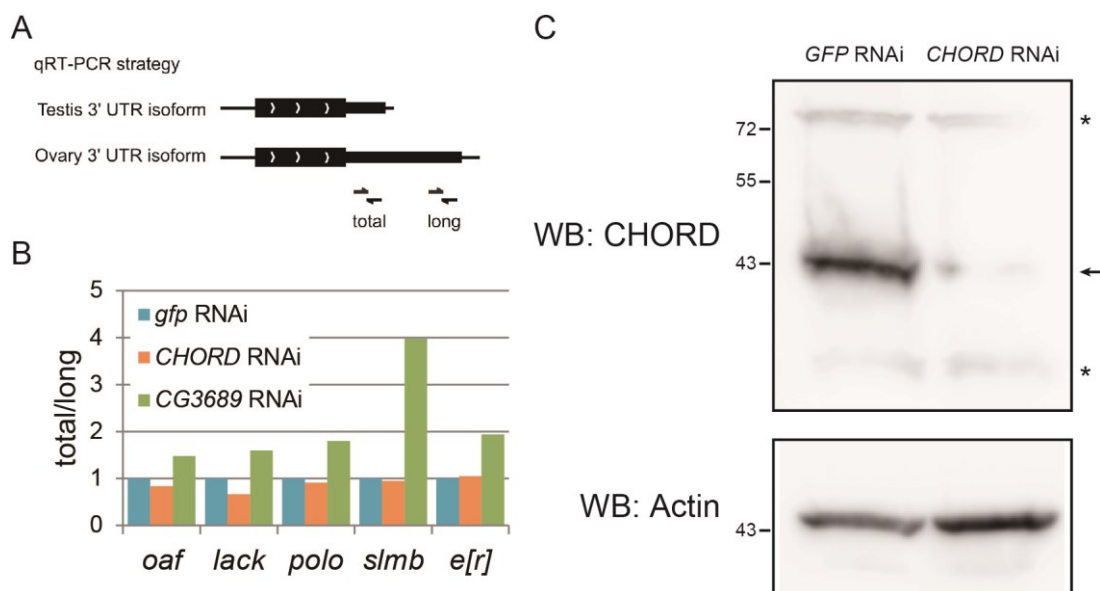


補図 2. 選択的ポリ A 付加

(A) 選択的ポリ A 付加の模式図。選択的ポリ A 付加により、異なる長さの 3'-UTR を持つ mRNA ができる。長い 3'-UTR に特異的な部分には、多くの場合 miRNA や RNA 結合タンパク質の結合サイトが存在しており、それぞれのアイソフォームは異なる制御を受けることが期待される。青色はタンパク質をコードする部分を、緑色は UTR を示している。(B) 選択的ポリ A 付加が影響を与える現象。(C) CFIm のノックダウンによる影響。CFIm をノックダウンすると短い 3'-UTR を持つ mRNA の割合が増加する（レーン 3 と 4）。(A) は Di Giammartino et al., 2011 を、(B) は Lutz and Moreira, 2011 を、(C) は Kubo et al., 2006 を元に改変。

A 付加に影響を与えることで、樹状突起サイズを制御しているのかもしれないと考え、以下では生化学的あるいは遺伝学的な手法を用いてこの可能性を追求した。

まず、ショウジョウバエの細胞において本当に CHORD と CG3689 の間に物理的な相互作用がみられるのかを検討した。S2 細胞において FLAG タグを付加した CHORD タンパク質と、HA タグを付加した CG3689 タンパク質を共発現し、抗 FLAG 抗体で免疫沈降を行ったが、CG3689 タンパク質は共沈しなかった（データは示さない）。従って、少なくとも今回試した条件では CHORD タンパク質



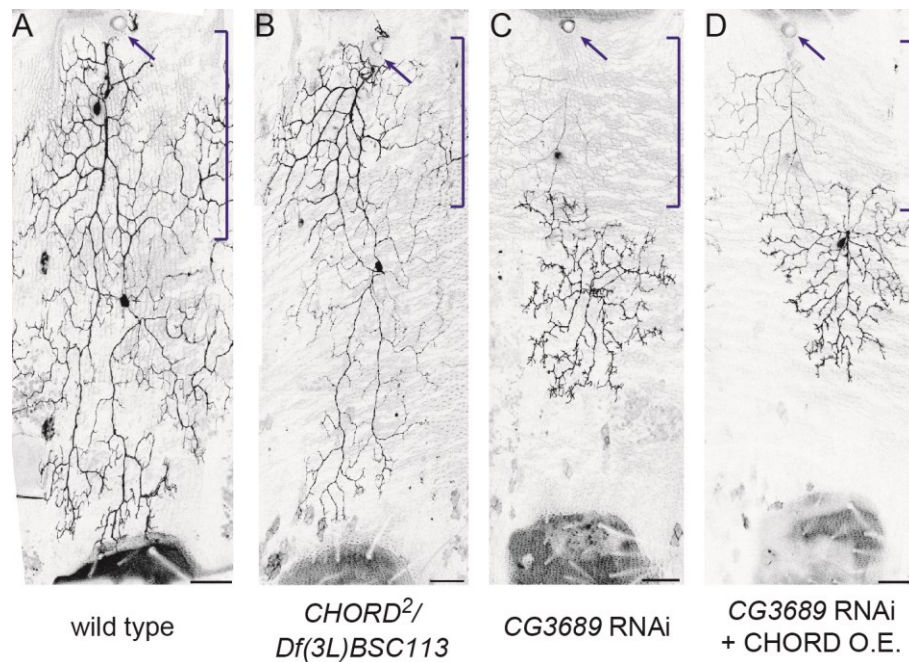
補図 3. *CHORD* または *CG3689* のノックダウンが 3'-UTR の長さに与える影響

(A と B) qRT-PCR 法による 3'-UTR の長さの異なる 2 つのアイソフォームの量比の定量化。3'-UTR の長い isoform のみを認識するプライマーセット (long) と、両方のアイソフォームを認識するプライマーセット (total) を用いて qRT-PCR を行い、それらの比を定量化した (B)。用いたプライマーの配列は Smibert et al., 2012 と同一のものを用いた。CG3689 をノックダウンした S2 細胞では total/long が増加していたのに対して、CHORD をノックダウンした細胞ではコントロールと比べて変化はなかった。(A) は Smibert et al., 2012 から引用。(C) CHORD のノックダウンの確認。コントロールまたは CHORD をノックダウンした細胞の細胞破碎液を抗 CHORD 抗体と抗 Actin 抗体で検出した。矢印は CHORD タンパク質のバンドを、アスタリスクは非特異的なバンドを示している。

と CG3689 タンパク質は結合しないことが示唆された。

物理的な相互作用は見られなかったものの、機能的には何らかの関連があるかもしれないと考え、次に *CHORD* もしくは *CG3689* をノックダウンした細胞において、選択的ポリ A 付加に影響があるかを調べた。具体的には、3'-UTR の長さの異なる 2 つのアイソフォームを持つ 5 つの遺伝子を対象として、3'-UTR の長いアイソフォームのみを認識するプライマーセット (long) と、両方のアイソフォームを認識するプライマーセット (total) を用いて qRT-PCR を行い、それらの比を定量化した (補図 3A)。その結果、*CG3689* 遺伝子をノックダウンした細胞では、total/long の比率の増加、すなわち短い 3'-UTR を持つ RNA の割合の増加が見られた。一方で、*CHORD* 遺伝子をノックダウンした細胞では、コントロール細胞と比べて変化は見られなかった (補図 3B)。*CHORD* 遺伝子をノックダウンした細胞では、内在の *CHORD* タンパク質が顕著に減少していたこと (補図 3C) と併せて考えると、*CHORD* は選択的ポリ A 付加には関与しない可能性が示唆された。

最後に、*v'ada* ニューロンにおける *CHORD* と *CG3689* の遺伝学的な相互作用を検討した。まず、*CHORD* 変異体と *CG3689* を含む欠失系統とのトランスヘテロ個体を観察したが、樹状突起パターンの異常は見られなかった (補図 4B)。さらに、*CG3689* をノックダウンした細胞において *CHORD* を過剰発現したが、ミニチュア表現型は全くレスキューされなかった (補図 4D)。以上の全ての結果から、*CHORD* と *CFIm* は異なる仕組みで樹状突起のサイズを調節していることが示唆された。

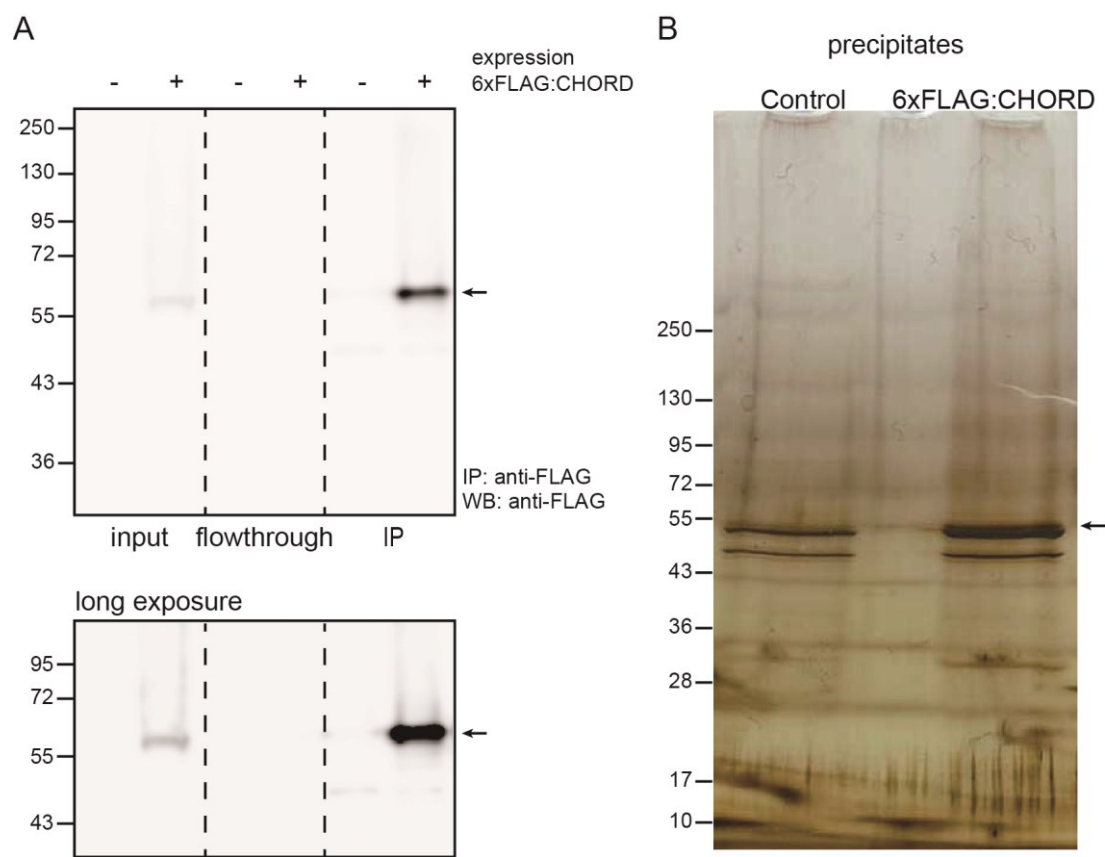


補図 4. CHORD と CG3689 の遺伝学的相互作用の検証

(A-D) 野生型ニューロン (A)、*CG3689* を含む欠失系統と *CHORD* 変異体のトランスヘテロ個体 (B)、*CG3689* をノックダウンしたニューロン (C) *CG3689* をノックダウンし、かつ *CHORD* を過剰発現したニューロン (D) の観察像。矢印は気門を示す。IdaA/IdaA-like ニューロンの樹状突起 (括弧で示した) もラベルされている。スケールバーは 50 μm 。

5.2. 新規の CHORD 結合タンパク質の探索

次に、新規の CHORD 結合タンパク質を同定するために、免疫沈降法を用いたスクリーニングを行った。まず、当研究室の過去の研究に基づき、ショウジョウバエの頭部を材料として実験を行った (Satoh et al., 2008; 佐藤, 2008; 松原, 2013)。6 つの FLAG タグを付加した CHORD タンパク質 (6xFLAG:CHORD) を全ての神経細胞で強制発現させ、成虫の頭部を回収して細胞破碎液を調製し、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行ったところ、CHORD タンパク質を効率良く回収することができた (補図 5A)。免疫沈降物に含まれるタンパク質を銀染色によって確認したところ CHORD 自身と考えられるバンドが、6xFLAG:CHORD の免疫沈降産物のみで検出できた (補図 5B)。しかしながら、それ以外にネガティブコントロールとの間で顕著な差があるバンドは見られなかった。免疫沈降物を質量分析によって解析したところ、6xFLAG:CHORD の免疫沈降産物に特異的に検出されたタンパク質は CHORD 自身を含む 27 種であった (補図 5B; 補表 2)。これらのタンパク質の大部分は、翻訳・分解に関わるタンパク質や還元酵素であり、一般的には非特異的な結合と考えられるものであった。実際、CHORD を除く 26 種のうち 16 種は、過去に当研究室で行われた Espinas あるいは Dlic を用いた免疫沈降実験においても同定されたものだった (Satoh et al., 2008; 佐藤, 2008; 松原, 2013)。また、先行研究から、他の種において結合が確認されている、HSP90 や SGT1 そして Rho-kinase といったタンパク質も検出されなかった。これらの結果は、今回の実験では CHORD に特異的に結合するタンパク質が得られていない可能性を示唆している。



補図 5. ショウジョウバエ頭部を材料とした免疫沈降実験

(A と B) 成虫の全神経系で 6xFLAG:CHORD を強制発現し、頭部を回収して細胞破碎液を調製した。細胞破碎液を抗 FLAG 抗体でブロットして、FLAG:CHORD の発現を確認した (A; input)。細胞破碎液に抗 FLAG 抗体を加えて免疫沈降を行い、抗 FLAG 抗体によるブロット (A; IP) または銀染色 (B) によって免疫沈降物中に含まれるタンパク質を調べた。(A) の下のパネルは露光時間を長くしたものである。(B) の矢印は CHORD タンパク質だと期待されるバンドを示している。input は細胞可溶化液の 0.15%を、IP は免疫沈降物の 5.8%をそれぞれ泳動した。

サーチでヒットしたタンパク名	コードする遺伝子 (D. Melanogaster)	スコア		分子の機能	過去の研究結果	
		Control	CHORD		松原ら	佐藤ら
CHORD containing protein [Drosophila melanogaster]	<i>CHORD</i>	0	410	zinc ion binding	-	-
GI11974 [Drosophila mojavensis]	<i>sepia</i>	0	156	glutathione transferase activity	+	-
ribosomal protein LP0 [Drosophila melanogaster]	<i>RpLP0</i>	0	105	structural constituent of ribosome	+	-
CG15602 [Drosophila melanogaster]	<i>CG15602</i>	0	90	unknown	+	-
RecName: Full=Glutathione S-transferase 1-1	<i>GstD1</i>	0	89	glutathione transferase activity	+	-
Cu-Zn superoxide dismutase [Drosophila melanogaster]	<i>Sod</i>	0	88	antioxidant activity; superoxide dismutase activity	+	-
actin E2 [Drosophila virilis]	<i>Actin 88F</i>	0	79	structural constituent of cytoskeleton	+	+
ribosomal protein S3A, isoform A [Drosophila melanogaster]	<i>RpS3A</i>	0	79	structural constituent of ribosome	+	+
actin [Drosophila melanogaster]	<i>Act42A</i>	0	77	structural constituent of cytoskeleton	+	+
eukaryotic initiation factor 4B, isoform B [Drosophila melanogaster]	<i>eIF-4B</i>	0	74	translation initiation factor activity	+	+
heat shock protein 23 [Drosophila melanogaster]	<i>Hsp23</i>	0	67	protein binding; actin binding	+	+
heat shock cognate 4 [Drosophila melanogaster]	<i>Hsc70-4</i>	0	66	chaperone binding; unfolded protein binding	-	-
ribosomal protein L30, isoform C [Drosophila melanogaster]	<i>RpL30</i>	0	55	structural constituent of ribosome	+	-
heat shock cognate protein [Drosophila simulans]	<i>Hsc70-1</i>	0	54	unfolded protein binding	+	-
RecName: Full=60S ribosomal protein L31	<i>RpL31</i>	0	54	structural constituent of ribosome	-	+
unnamed protein product [Drosophila melanogaster]	<i>Actin 5C</i>	0	53	structural constituent of cytoskeleton	+	+
GF15114 [Drosophila ananassae]	<i>ApepP</i>	0	52	aminopeptidase activity; metalloaminopeptidase activity	-	-
GF15422 [Drosophila ananassae]	<i>CG10600</i>	0	52	unknown	-	-
GM24774 [Drosophila sechellia]	<i>CG32071</i>	0	49	unknown	-	-
CG1440, isoform A [Drosophila melanogaster]	<i>CG1440</i>	0	49	cysteine-type endopeptidase activity	+	-
GK23924 [Drosophila willistoni]	<i>CG15443</i>	0	48	unknown	-	-
dally-like protein [Drosophila melanogaster]	<i>dlp</i>	0	47	Wnt-protein binding; heparan sulfate proteoglycan binding	-	-
GL13986 [Drosophila persimilis]	<i>CG15545</i>	0	47	unknown	-	-
GH17009 [Drosophila grimshawi]	<i>Hsp27</i>	0	46	protein binding	-	-
GG16902 [Drosophila erecta]	<i>CG42404</i>	0	45	unknown	-	-
GE24334 [Drosophila yakuba]	<i>CG5614</i>	0	45	unknown	-	-
CG31999 [Drosophila melanogaster]	<i>CG31999</i>	0	45	calcium ion binding	+	-

補表 2. ショウジョウバエ頭部を材料とした免疫沈降実験によって同定した CHORD 結合タンパク質の候補

そこで次に、免疫沈降の条件をさらに検討し、より良い条件の決定を試みた。ショウジョウバエの頭部を用いた実験には手間と時間がかかるため、複数の条件を比較検討することが困難であったため、培養細胞を材料に実験を行うこととした。具体的には、

1. S2 細胞の細胞破碎液を材料にした抗 CHORD 抗体による免疫沈降実験
2. 6xFLAG:CHORD を過剰発現した S2 細胞の細胞破碎液を材料にした抗 FLAG 抗体による免疫沈降実験
3. 3 つの FLAG タグを付加したヒト CHORD ホモログ (3xFLAG:CHORDC1) を過剰発現した HEK293 細胞の細胞破碎液を材料にした抗 FLAG 抗体による免疫沈降実験

以上の 3 つの条件を試した。また、非特異的な結合を減少させるために、免疫沈降に用いるビーズをアガロースからマグネットに変更した。まず、各条件での免疫沈降産物をウェスタンブロット法によって確認したところ、いずれの条件においても CHORD 自身のバンドが検出された (補図 6A)。これらの免疫沈降物に含まれるタンパク質を銀染色によって確認したところ、条件 1 のサンプルについては、高分子量付近にネガティブコントロールでは見られないバンドが複数検出された (補図 5B)。条件 2 と 3 についてはネガティブコントロールとの間でバンドパターンに大きな差は見られなかった。以上の結果から、免疫沈降に用いる材料と抗体は条件 1 を採用することとし、続いて可溶化バッファーについても条件の検討を行った。具体的には、哺乳類の培養細胞における CHORD のホモログによる免疫沈降実験の条件を参考にし、以下の 3 つの可溶化バッファーを試した。

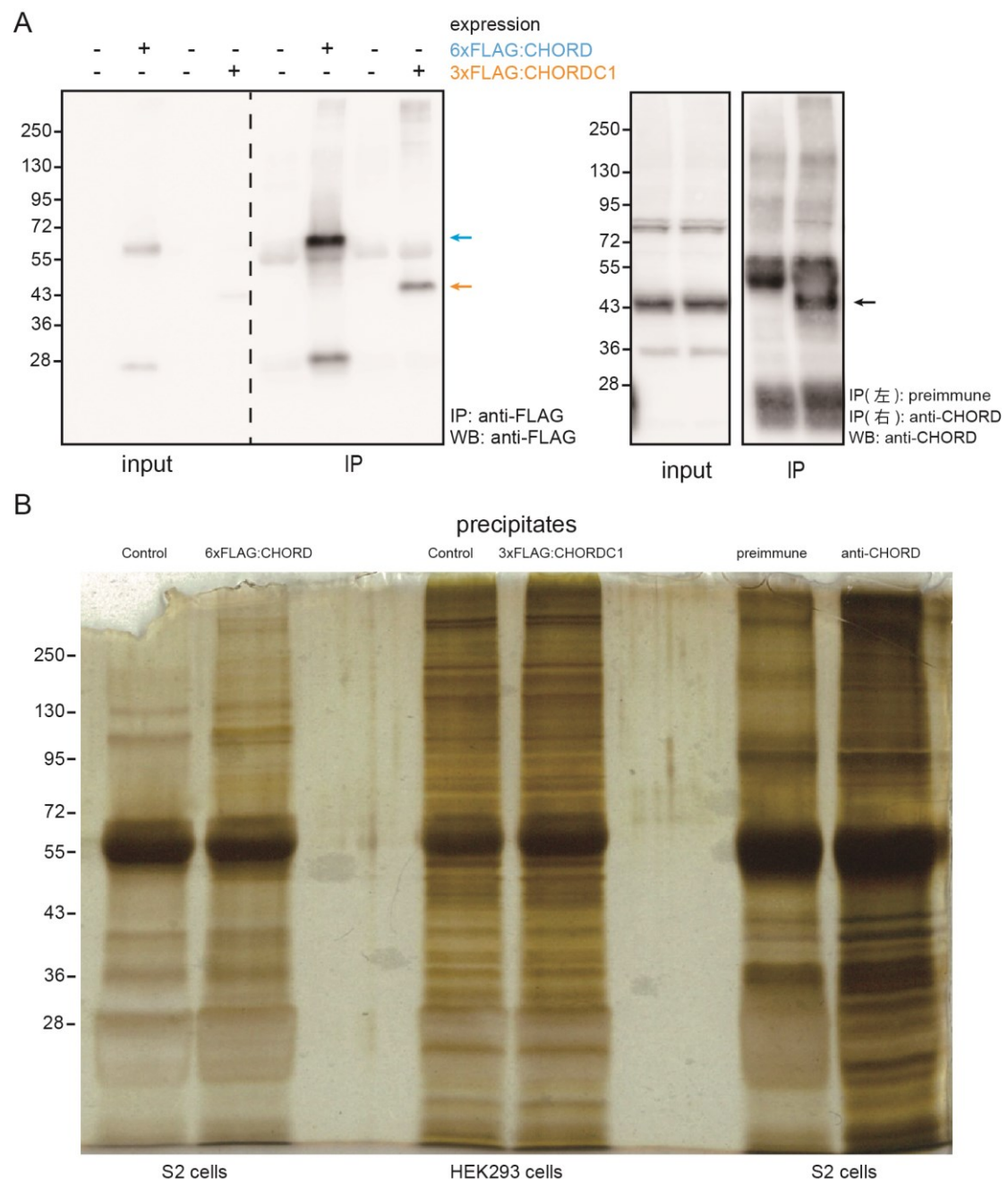
(補表 2 の続き)

6xFLAG:CHORD を発現させた頭部を材料とした免疫沈降物に特異的に含まれるタンパク質のリスト。松原, 2013 または佐藤, 2008 において, Espinas (松原ら) または Dlic (佐藤ら) を用いた免疫沈降実験にでも検出された場合を+, 検出されなかった場合を-と表記した。

- Lysis buffer A (Ferretti et al., 2010): 20mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.5% NP-40, Complete mini, PhosSTOP (補図 6 の実験でも用いた)
- Lysis buffer B (Wu et al., 2005): 20mM HEPES (pH7.4), 10mM NaCl, 1M MgCl₂, 0.01% NP-40, 1mM DTT, 05M EDTA, Complete mini, PhosSTOP
- Lysis buffer C (Wu et al., 2005): 20mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1mM DTT, 1mM EDTA, Complete mini, PhosSTOP

バッファーBについては細胞を可溶化することができなかったため、バッファーA または C を用いて細胞を可溶化し、免疫沈降を行った。免疫沈降産物をウェスタンブロッティングによって確認したところ、いずれの条件においても CHORD タンパク自身が濃縮されていた(補図 6A)。また、免疫沈降物に含まれるタンパク質を銀染色によって確認したところ、6xFLAG:CHORD の免疫沈降産物に特異的なバンドが複数検出された(補図 6B)。

これらの免疫沈降産物に含まれるタンパク質を質量分析によって解析したところ、6xFLAG:CHORD の免疫沈降産物に特異的に検出されたタンパク質は CHORD 自身を含む 24 種で、そのうちどちらのバッファー条件においても検出されたタンパク質は 9 種であった(補表 3)。得られたタンパク質のスコアは CHORD 自身と比べてかなり低く、非特異的と思われるタンパク質が多かった。また、HSP90 などの既知の CHORD 結合タンパク質は共沈していなかった。従って、この条件においても CHORD 特異的な結合タンパク質は得られていない可能性が高いことが示唆された。最後に念のため、ショウジョウバエの頭部を用いて行った実験と S2 細胞を用いて行った実験の両方で検出された Hsc70-4 について、5'-UTR にトランスポゾンが挿入した変異体を用いて MARCM 解析を行ったところ、樹状突起の形態に顕著な異常は見られなかった(データは示さない)。従って、Hsc70-4 は樹状突起のサイズ制御にはおそらく必要ではないと結論付け、ここでこのプロジェクトは中止した。



補図 6. ショウジョウバエ頭部を材料とした免疫沈降実験

(A と B) 6xFLAG:CHORD を強制発現した S2 細胞、3xFLAG:CHORDC1 を強制発現した HEK293 細胞または、野生型の S2 細胞から細胞破碎液を調製した。細胞破碎液を抗 FLAG 抗体または抗 CHORD 抗体でブロットして、FLAG:CHORD (青またはオレンジ矢印) または内在の CHORD タンパク質 (黒矢印) の発現を確認した (A; input)。細胞破碎液に抗 FLAG 抗体または抗 CHORD 抗体を加えて免疫沈降を行い、抗 FLAG 抗体または抗 CHORD 抗体によるブロット (A; IP) または銀染色 (B) によって免疫沈降物に含まれるタンパク質を調べた。input は細胞可溶化液の 0.67% を、IP は免疫沈降物の 40% をそれぞれ泳動した。

タンパク名	スコア				分子の機能
	コントロール		FLAG:CHORD		
	Buffer A	Buffer C	Buffer A	Buffer C	
CHORD			730.97	444.95	
bel			1.70		ATP-dependent RNA helicase activity
CG3164			4.67		ATPase activity, coupled to transmembrane movement of substances; transporter activity
mute				3.63	unknown
eIF-4B			17.50		translation initiation factor activity
Ubi-p5E			3.32		unknown
sesB				4.82	ATP:ADP antiporter activity
Ykt6			2.06		SNAP receptor activity
Jafrac1			2.45		thioredoxin peroxidase activity
TER94			13.80		ATPase activity
Vap-33-1			2.30		structural molecule activity
Act57B			6.70	0.00	structural constituent of cytoskeleton
alphaTub85E			5.23	7.36	structural constituent of cytoskeleton
betaTub56D			15.13	3.68	structural constituent of cytoskeleton; GTP binding
Hsc70-3			4.42	6.47	ATPase activity
Hsc70-4			43.88	8.21	chaperone binding
RpS14a			9.62		structural constituent of ribosome
RpS18			5.34	9.88	structural constituent of ribosome
RpS25			1.96		structural constituent of ribosome
RpS3			8.94	6.20	structural constituent of ribosome
RpL23			4.99		protein binding
RpL27A				6.09	structural constituent of ribosome
RpL31			3.42		structural constituent of ribosome
RpL37A			10.52	4.58	structural constituent of ribosome

補表3. S2細胞を材料とした免疫沈降実験によって同定したCHORD結合タンパク質の候補

6xFLAG:CHORD を発現させた S2 細胞を材料とした免疫沈降物に特異的に含まれるタンパク質のリスト。

5.3. CHORD の上流に存在する受容体の探索

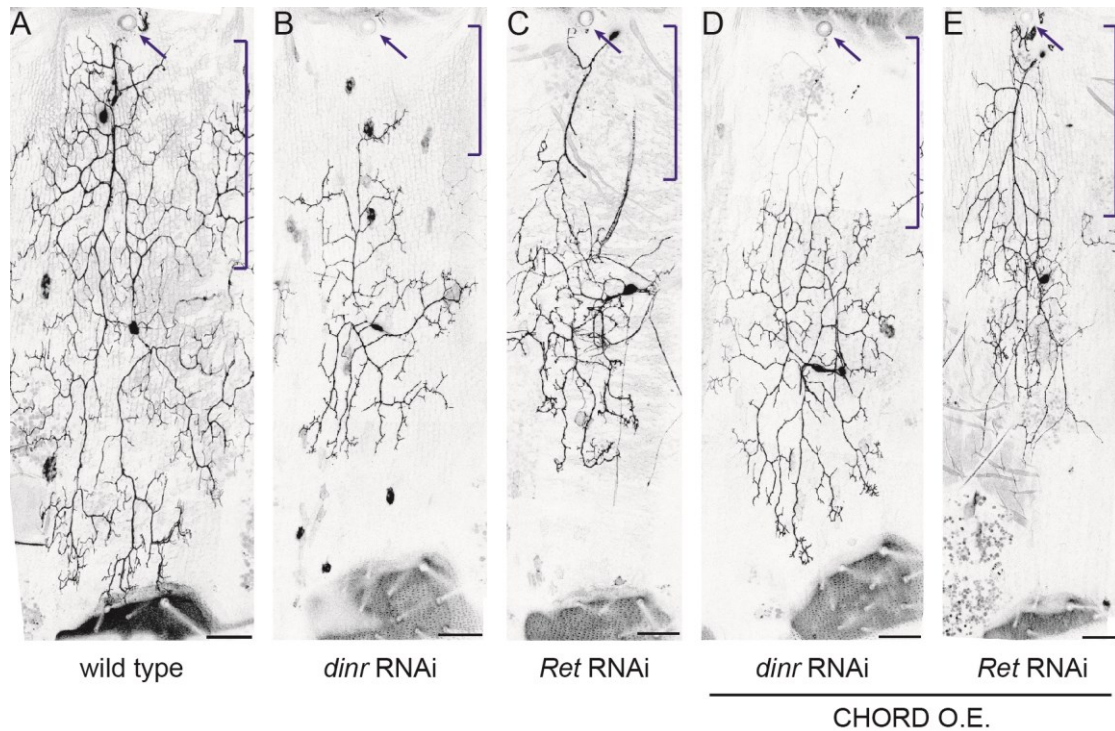
私の作業仮説に基づくと、v'ada ニューロンは体の大きさや栄養条件といった細胞外環境を感知していることが予想される。CHORD は細胞質に存在する分子であるため、上流として体のサイズを感じる受容体が存在することを期待し、以下では CHORD の上流として機能する受容体の探索を行った。

まず、ショウジョウバエの遺伝子の中から、細胞膜に存在する受容体をコードする遺伝子を絞り込んだ。具体的には、ショウジョウバエの遺伝子情報データベースである Flybase において、gene ontology term (GO term) に「transmembrane signaling receptor activity」を持つ 352 遺伝子を抽出した。それらの中で Transgenic RNAi Project (TRiP) によって作製された RNAi 系統が存在する 186 遺伝子を対象に、ノックダウンスクリーニングを行った。その結果、樹状突起の形態に異常を示す 13 系統を分離した(補表 4; 補図 7A-C)。これらの中には、*drosophila insulin receptor (dinr)*、*domeless (dome)*、*Anaplastic Lymphoma Kinase (Alk)* といった栄養シグナルに関わるものが複数含まれていた (Cheng et al., 2011; Rajan and Perrimon, 2012)。次に 2 次スクリーニングとして、これらの遺伝子をノックダウンしたニューロンで CHORD を過剰発現し、表現型に変化が見られるかを調べたが、いずれの遺伝子においてもそのような遺伝学的な相互作用は見られなかった(補図 7D と E)。従って、このスクリーニングで見いだした受容体の中には、CHORD の上流として働く受容体はないのかもしれない。

遺伝子名	分子の機能	系統番号	表現型
<i>NMDA receptor 1</i>	N-methyl-D-aspartate selective glutamate receptor activity	25941	成長不全型
<i>Ret oncogene</i>	ephrin receptor activity	25948	ミニチュア型
<i>Odorant receptor 47b</i>	olfactory receptor activity	27274	成長不全型
<i>Alk</i>	transmembrane receptor protein tyrosine kinase activity	27518	成長不全型
<i>robo3</i>	axon guidance receptor activity	29398	成長不全型
<i>Resistant to dieldrin</i>	GABA-A receptor activity	31286	成長不全型
<i>domeless</i>	protein tyrosine phosphatase activity	32860	成長不全型
<i>Notch</i>	transmembrane signaling receptor activity	33611	成長不全型
<i>IA-2 ortholog</i>	transmembrane receptor protein tyrosine phosphatase activity	33672	成長不全型
<i>Leukocyte-antigen-related-like</i>	transmembrane receptor protein tyrosine phosphatase activity	34965	成長不全型
<i>Insulin-like receptor</i>	insulin-activated receptor activity	35251	成長不全型
<i>Trissin receptor</i>	G-protein coupled receptor activity	36825	成長不全型
<i>Protein tyrosine phosphatase 4E</i>	transmembrane receptor protein tyrosine phosphatase activity	38369	成長不全型

補表 4. RNAi スクリーニングによって分離した受容体

ノックダウンによって v'ada ニューロンの樹状突起パターンに異常を示す遺伝子のリスト。ミニチュア型の樹状突起異常を示す遺伝子 (*Ret oncogene*) もあった。



補図 7. RNAi スクリーニングで得られた観察像

(A-E) 野生型ニューロン (A)、*drosophila insulin receptor* (*dinr*) をノックダウンしたニューロン (B)、*Ret oncogene* (*Ret*) をノックダウンしたニューロン(C)、*dinr* または *Ret* をノックダウンし、かつ CHORD を過剰発現したニューロンの観察像 (D と E)。矢印は気門を示す。IdaA/IdaA-like ニューロンの樹状突起 (括弧で示した) もラベルされている。スケールバーは 50 μ m。

第6章 材料と方法

6.1. 分子生物学的手法

6.1.1. コンストラクトの作製

SOP-FLP の作製には、da neuron の前駆細胞で発現する転写因子である Scute の DNA 結合配列を6つタンデムに結合した[scE1]₆を用いた (Powell et al., 2004)。pUAS-flp (Drosophila Genomic Resource Center) を鋳型として、*hsp70* minimal promoter と *flp* 遺伝子の ORF を増幅し、[scE1]₆ と SV40 polyA 配列の間に挿入した。この SOP-FLP トランスジーンは、pHStinger または pUAST (UAS なし) に挿入した。ここで、pUAST (UAS なし) は、pUAST を EcoRI と PstI で切断して UAS 配列を除去し、末端を平滑化した後、セルフライゲーションをさせることで作製したコンストラクトである。

レスキューコンストラクトの作製には、*CHORD* 遺伝子を含む 4754 bp (第3染色体右腕の 20009616-20013777; version FB2013_05) を pCasper にクローニングした。また、*UAS-CHORD* は、*CHORD* cDNA (Drosophila Genomic Resource Center #RE04143) を元に *CHORD* 遺伝子の ORF を増幅し、pUASTattB にクローニングした。*UAS-6xFLAG:CHORD* については、*yw* のゲノムから *CHORD* の遺伝子領域を増幅し、N 末に 6xFLAG tag が付いた pUAST にクローニングした。

UAS-3HA:CG3689RB と *UAS-3HA:CG3689RC* は CG3689 遺伝子の ORF を含む cDNA (Drosophila Genomic Resource Center #SD03330) を元に増幅し、N 末に 3xHA tag が付いた pUASTattB にクローニングした。*UAS-CHORD^{RNAi}* は、以下のターゲット配列を合成し、pUASTattB にクローニングした。

UAS-CHORD^{RNAi} #1: 5'-CACCGAGTTCCTCAACATCAA-3'

UAS-CHORD^{RNAi} #2: 5'-TTGACCTGGATGACATTAAA-3'

6.1.2. ゲノム DNA の回収と genomic PCR、変異の同定

DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) を用いて、成虫 5 匹から DNA を抽出し、

200 μ l の TE に溶解させた。*CHORD* 変異体の 1 塩基の欠失変異の検出には、DNA0.1 匹分をテンプレートとして、CHORD-cDNA-F1 プライマーと CHORD-cDNA-R1 プライマーを用いて *CHORD* 遺伝子領域を増幅し、CHORD-F3 プライマーを用いて塩基配列を決定した。塩基配列の決定には、BigDye terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いた。使用したプライマーの配列は以下の通りである。

CHORD-cDNA-F1: 5'-ATGCGGCCCGCCACCATGGAACAATGCTATAACAG-3'

CHORD-cDNA-R1: 5'-GGTACCATTTAATCTAAGTTGTTTGGGC-3'

CHORD-F3: 5'-CCATTGATTCGCCGCTAACC-3'

6.1.3. dsRNA の合成

GFP、*CHORD* もしくは *CG3689* の ORF 全長を、cDNA を鋳型として、T7 promoter 配列を付加したプライマー (CHORD-RNAi-Fw と CHORD-RNAi-Rv、*CG3689*-RNAi-Fw と *CG3689*-RNAi-Rv、または *GFP*-GNAi-Fw と *GFP*-RNAi-Rv) を用いて増幅した。増幅した cDNA は Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用いて精製し、MEGAscript® T7 Transcription Kit (Invitrogen) を用いて in vitro 転写を行った。転写産物は RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて精製し、RNase free water 100 μ l に溶解した。その後、65°C で 30 分間インキュベートし、その後室温までゆっくりと冷やしてアニーリングさせた。使用したプライマーの配列は以下の通りである。

GFP-RNAi-Fw: 5'-TAATACGACTCACTATAGGGATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG-3'

GFP-RNAi-Rv: 5'-TAATACGACTCACTATAGGGCTTGTACAGCTCGTCCATGC-3'

CHORD-RNAi-Fw: 5'-TAATACGACTCACTATAGGGATGGAACAATGCTATAACAG-3'

CHORD-RNAi-Rv: 5'-TAATACGACTCACTATAGGGTTAATCTAAGTTGTTTGGGC-3'

CG3689-RNAi-Fw: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG ATGGCGTCCTCGCAAGTCTC-3'

CG3689-RNAi-Rv: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG CCTTTTCATGTAGCTGGACG-3'

6.2. 遺伝学的スクリーニング

6.2.1. MARCM 法を用いた順遺伝学的スクリーニング

遺伝学的スクリーニングには、常染色体に *piggyBac* トランスポゾンが挿入した突然変異体コレクション (Schuldiner et al., 2008) を用いた。これらの系統は挿入位置が決定されている上に、すぐに MARCM 解析に使えるように作製されているため、SOP-FLP 系統と交配させるだけで *da neuron* を突然変異のホモ接合体とし、かつ蛍光タンパク質を発現させてその樹状突起パターンを可視化できる。またトランスポゾンにはスプライシングのアクセプター配列と翻訳の終止コドンが導入されており、突然変異誘発能が高いことが示されている (Schuldiner et al., 2008)。

第二染色体左腕、第三染色体左腕、または第三染色体右腕にトランスポゾンが挿入した系統 1537 系統について樹状突起パターンを指標としたスクリーニングを行い、成長不全表現型を示す系統を 19 系統、ミニチュア型表現型を示す系統を 3 系統 (*LL04611*、*LL04133*、*LL03277*) を、それぞれ分離した (表 1)。第三染色体左腕のスクリーニングについては、野村尚史氏が行った。スクリーニングに用いた SOP-FLP 系統は以下の通りである。

第二染色体左腕：*Gal4⁵⁻⁴⁰ UAS-Venus;pm SOP-FLP^{#42}; tubP-Gal80 FRT40A*

第三染色体左腕：*SOP-FLP^{#42}; Gal4¹⁰⁹⁽²⁾⁸⁰ UAS-mCD8:GFP SOP-FLP^{#73}/CyO; tubP-Gal80 FRT2A*

第三染色体右腕：*hsFLP UAS-mCD8:GFP; Gal4¹⁰⁹⁽²⁾⁸⁰ UAS-mCD8:GFP SOP-FLP^{#73}/CyO; FRT82B tubP-Gal80*

ID Number	遺伝子名	表現型
LL00066	<i>heph</i>	成長不全型
LL00232	<i>Gyc-89Db</i>	成長不全型
LL00779	<i>I(3)01239, CG7839</i>	成長不全型
LL01235	<i>TfIIIFalpha, CG1024</i>	成長不全型
LL01237	<i>pum</i>	成長不全型
LL02779	<i>Rel, Nmdmc</i>	成長不全型
LL06331	<i>Mbs</i>	成長不全型
LL03277	<i>krz, mod</i>	ミニチュア型
LL03972	<i>sda</i>	成長不全型
LL04133	<i>Spase22-23, Acp95EF</i>	ミニチュア型
LL04168	<i>Bub3, CAP-D2</i>	成長不全型
LL04239	<i>Tor</i>	成長不全型
LL04611	<i>ModSP</i>	ミニチュア型
LL04839	<i>CG11815, CG1139</i>	成長不全型
LL01162	<i>SMC1</i>	成長不全型
LL05277	<i>sar1</i>	成長不全型
LL05452	<i>Rab11</i>	成長不全型
LL05552	<i>Trn-SR</i>	成長不全型
LL06325	<i>Pect, CG16972</i>	成長不全型
LL06541	<i>btsz</i>	成長不全型
LL03660	<i>pasha</i>	成長不全型
LL06861	<i>exba</i>	成長不全型

表 1. 樹状突起パターンに異常を示す変異体

遺伝学的スクリーニングによって分離した変異体の ID Number、トランスポゾンの挿入位置の付近に存在する遺伝子と表現型をまとめた。

6.2.2. ミニチュア表現型の原因遺伝子のマッピング

まず、*LL04611* 変異体に注目して解析を行った。*LL04661* 変異体は、*ModSP* 遺伝子の上流に *piggyBac* が挿入している。そこで、*ModSP* 遺伝子のノックアウトショウジョウバエ (Buchon et al., 2009) の表現型を調べたが、全く異常を示さなかった。*piggyBac* をゲノムから正確に除いたリバータント系統を作製したところ、依然として致死性と樹状突起パターンの異常を示した。従って、*LL04661* 変異体の表現型は、バックグラウンド変異が原因で生じていることが示唆された。そこで *LL04133* 変異体についても *piggyBac* をゲノムから正確に取り除いたリバータント系統を作製したところ、こちらも致死性と樹状突起パターンの異常を示した。さらに、*LL04611*、*LL04133*、*LL03277* の 3 系統の相補試験を行ったところ、致死性を相補しなかったことから、これらの系統は同一の遺伝子にバックグラウンド変異を有しており、その変異によってミニチュア表現型が生じていることが示唆された。

次に、これらの変異体のミニチュア表現型の原因遺伝子を同定するために、次世代シーケンサを用いたマッピングを行った。*LL04661*、*LL04133* の 2 系統、そしてコントロールとして成長不全表現型を示す *LL02779*、*LL00232* の 2 系統の計 4 系統のヘテロ接合体の全ゲノム配列を illumina Genome Analyzer II または HiSeq2000 を用いて決定した。リードデータ (DDBJ において公開予定; accession number は DRA001847) は Burrows-Wheeler Aligner (BWA) を用いてレファレンス配列 (flybase version 5.35) にマッピングした。ここで、解析した 4 系統は全て第三染色体右腕にトランスポゾンが挿入している系統であり、MARCM 法の原理から、原因となるバックグラウンド変異も第三染色体右腕に存在することが分かっている。そこで次に、SAMtools を用いて第三染色体右腕に存在する多型 (一塩基多型、短い欠失と挿入) を抽出した。次に、各変異体系統の間で多型のリストを比較することで、*LL04661* と *LL04133* に存在し、*LL02779* と *LL00232* にはない変異を同定した。この中で終止コドンへの変異、またはフレームシフトを引き起こす多型のみに絞ると、*CHORD* 遺伝子内の 1 塩基の欠失のみであっ

た。この変異は、平行して行った、Bloomington Deficiency Kit を用いた致死性の相補マッピングで絞り込んだ 45 kb の中にこの変異が存在したため、*CHORD* 遺伝子が原因遺伝子である可能性が強く示唆された。

6.2.3. 変異体の戻し交配

CHORD 遺伝子内の突然変異以外の突然変異を除去するため、*LL04661* から得られたリバータント系統を、*FRT82B* に 3 回戻し交配を行った。ここで、*FRT82B* は、*FRT82B ry⁵⁰⁶* (Drosophila Genetic Resource Center #106637) と *yw* の間で相同染色体の組み替えを起こして作製した系統であり、本研究では野生型として用いている。

6.3. ショウジョウバエ関連

6.3.1. 用いた系統と飼育法

キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) の飼育は、基本的に 25℃ で行った。細胞の可視化やトランスジーンの発現には GAL4-UAS システムを用いた (Brand and Perrimon, 1993)。da neuron を可視化するために、Gal4 系統としては *Gr28b.c* (Thorne and Amrein, 2008; Xiang et al., 2010) と *Gal4⁵⁻⁴⁰* (Song et al., 2007)、*Gal4¹⁰⁹⁽²⁾⁸⁰* (Gao et al., 1999) を、UAS 系統としては *UAS-mCD8:GFP* (Bloomington #5137) と *UAS-Venus-pm* (Sato et al., 2010; Sugimura et al., 2003; Yamamoto et al., 2006) を用いた。その他には、*dinr³³⁹* (Brogiolo et al., 2001)、*Akt^q* (Staveley et al., 1998)、*Tor^{AP}* (Zhang et al., 2000)、*rok²* (Winter et al., 2001)、*UAS-dicer2* (VDRC #60009)、*UAS-raptor^{RNAi}* (Bloomington #34814)、*UAS-mCherry^{RNAi}* (Bloomington #35785)、*UAS-CHORD^{RNAi}*、*UAS-CHORD*、*UAS-6xFLAG:CHORD*、*CHORD genomic fragment*、*UAS-Dp110^{D954A}* (Bloomington #25918)、*UAS-rok^{RNAi}* (VDRC #3793 と #104675; Bloomington #28797 と #34324、#35305)、*UAS-hsp90^{RNAi}* (Bloomington #33947)、*UAS-Rok.CAT^{48.2}* (Simões et al., 2010)、*UAS-CG3689^{RNAi}* (Bloomington #32883)、*UAS-CG7185^{RNAi}* (Bloomington #34804)、*UAS-dinr^{RNAi}*

(Bloomington #35251)、*UAS-Ref^{RNAi}* (Bloomington #25948) を用いた。それぞれの図の遺伝子型については、表 2 にまとめた。

図番号	遺伝子型
5C, 6B, 7A, 7B, 8A, 11A, 16A, 21A, 21BC, 21E, 21G	<i>Gal4⁵⁻⁴⁰ UAS-Venus:pm SOP-FLP#42/+; +/+; FRT82B/FRT82B tubPGal80</i>
8B	<i>Gal4⁵⁻⁴⁰ UAS-Venus:pm SOP-FLP#42/+; +/+; FRT82B Akt^d/FRT82B tubPGal80</i>
8C	<i>Gal4⁵⁻⁴⁰ UAS-Venus:pm SOP-FLP#42/+; +/+; FRT82B dinr³³⁹/FRT82B tubPGal80</i>
8D	<i>Gal4⁵⁻⁴⁰ UAS-Venus:pm SOP-FLP#42/+; tol^{deltaP} FRT40A/tubPGal80 FRT40A</i>
8E	<i>Gr28b.c.Gal4 UAS-mCD8:GFP/UAS-Dp110[D954A]</i>
8F	<i>Gr28b.c.Gal4 UAS-mCD8:GFP/+; TriP{HMS00124}/+</i>
11B, 13A, 13B, 17H, 17K, 17L, 21B, 21D, 21F, 21H	<i>Gal4⁵⁻⁴⁰ UAS-Venus:pm SOP-FLP#42/+; +/+; FRT82B CHORD²/FRT82B tubPGal80</i>
11C	<i>Gal4⁵⁻⁴⁰ UAS-Venus:pm SOP-FLP#42/+; CHORD genomic fragment/+; FRT82B CHORD²/FRT82B tubPGal80</i>
14A, 14C, 14D	<i>Gr28b.c. UAS-mCD8:GFP/+; UAS-tubPGal80^{ts}/UAS-mCD8.mRFP</i>
14B	<i>Gr28b.c. UAS-mCD8:GFP/+; UAS-tubPGal80^{ts}/TriP{HMS00899}</i>
16B	<i>Gal4⁵⁻⁴⁰ UAS-Venus:pm SOP-FLP#42/+; UAS-Rok.CAT^{48.2}/+; FRT82B CHORD²/FRT82B tubPGal80</i>
17A, 19A	<i>FRT19A/FRT19A tubPGal80; Gal4¹⁰⁹⁽²⁾⁸⁰ UAS-mCD8:GFP SOP-FLP#73/+</i>
17B	<i>FRT19A rok²/FRT19A tubPGal80; Gal4¹⁰⁹⁽²⁾⁸⁰ UAS-mCD8:GFP SOP-FLP#73/+</i>
17C	<i>Gr28b.c.Gal4 UAS-mCD8:GFP/UAS-CHORD IR#1; UAS-dcr2/+</i>
17D	<i>Gr28b.c.Gal4 UAS-mCD8:GFP/UAS-CHORD IR#1; TriP(JF03225)/+</i>
17E	<i>Gr28b.c.Gal4 UAS-mCD8:GFP/UAS-CHORD IR#1; TriP(HMS01311)/+</i>
17F	<i>Gr28b.c.Gal4 UAS-mCD8:GFP/UAS-CHORD IR#1; TriP(GL00209)/+</i>
17G	<i>FRT19A rok²/FRT19A tubPGal80; Gal4¹⁰⁹⁽²⁾⁸⁰ UAS-mCD8:GFP SOP-FLP#73/UAS-CHORDIR#1</i>

図番号	遺伝子型
17I	<i>Gal4⁵⁻⁴⁰ UAS-Venus;pm SOP-FLP#42/+; (GD1522)v3793/+; FRT82B CHORD2/FRT82B tubPGal80</i>
17J	<i>Gal4⁵⁻⁴⁰ UAS-Venus;pm SOP-FLP#42/+; (KK107802)VIE-260B/+; FRT82B CHORD²/FRT82B tubPGal80</i>
19B	<i>FRT19A rictor^{Δ2}/FRT19A tubPGal80; Gal4¹⁰⁹⁽²⁾⁸⁰ UAS-mCD8:GFP SOP-FLP#73/+</i>
19C	<i>FRT19A rictor^{Δ2}/FRT19A tubPGal80; Gal4¹⁰⁹⁽²⁾⁸⁰ UAS-mCD8:GFP SOP-FLP#73/UAS-CHORD</i>
補 1A, 補 4A, 補 7A	<i>Gr28b.c. UAS-mCD8:GFP/+; mCherry IR/+</i>
補 1B, 補 4C	<i>Gr28b.c. UAS-mCD8:GFP/+; TRiP(HMS00671)/+</i>
補 1C	<i>Gr28b.c. UAS-mCD8:GFP/+; TRiP(HMS00113)/+</i>
補 4B	<i>Gr28b.c. UAS-mCD8:GFP/+; RT82B CHORD²/Df(3L)BSC113</i>
補 4D	<i>Gr28b.c. UAS-mCD8:GFP/UAS-CHORD; TRiP(HMS00671)/+</i>
補 7B	<i>Gr28b.c. UAS-mCD8:GFP/+; TRiP{GL00139}/UAS-dicer²</i>
補 7C	<i>Gr28b.c. UAS-mCD8:GFP/+; TRiP{JF01968}/UAS-dicer²</i>
補 7D	<i>Gr28b.c. UAS-mCD8:GFP/UAS-CHORD; TRiP{GL00139}/UAS-dicer²</i>
補 7E	<i>Gr28b.c. UAS-mCD8:GFP/UAS-CHORD; TRiP{JF01968}/UAS-dicer²</i>

表 2. 実験に用いた遺伝子型

6.3.2. トランスジェニック系統の作製

SOP-FLP 系統の作製には、*SOP-FLP* をクローニングしたベクターと pTURBO を 10:1 の重量比で混合し、エタノール沈殿後、1.1μg/μl となるよう milliQ 水に溶解した。これを *yw* のハエから集めた、産卵後 15-30 min の卵の後極にガラスマイクロピペットを用いてマイクロインジェクションした。その他のコンストラクトについては、Best Gene に依頼した。pUASTattB にクローニングしたコンストラクトについては attP40 (第 2 染色体) または attP2 (第 3 染色体) に挿入し

た。

6.3.3. 飢餓条件下での飼育

エッグコレクションカップに成虫を入れ、酵母の練りエサを置いたアップルプレート上に6時間産卵させた。採取した個体を91時間インキュベートし、91-97 hr AEL の幼虫を回収した。回収した幼虫は 0.7% NaCl + 0.3% Triton X-100 で数回洗ってエサを落とし、最後に PBS で1回洗った。その後湿らせたキムワイプを入れた空のバイアルに幼虫を移し、成虫まで発生させた。

6.3.4. 蛹への薬剤の投与

適切な発生段階（後述）の蛹を両面テープの上に乘せ、ピンセットで囲蛹殻を剥き、傷つけないように蛹を取り出した。ガラスマイクロピペットを用いて体表に穴を開け、体液を少し押し出した後、同じ穴から薬剤を注入した。阻害剤の濃度は、条件検討を行い、個体が死なない範囲でできるだけ高い濃度を採用した。具体的には、17-DMAP-GA (InvivoGen) は 5 mg/ml、Y-27632 (ナカライテスク) は 10 mM または 50 mM の濃度を採用した。阻害剤の投与は、17-DMAP-GA は 60-63 hr APF、Y-27632 は 48 hr APF でそれぞれ行った。

6.4. ライブイメージング

6.4.1. ホールマウント成虫の観察

成虫は羽化後 12 時間以内の個体を採取し、汚れを落とすため、0.7% NaCl + 0.3% Triton X-100 で 3 回、PBS で 1 回洗い、頭部と脚を切断した。その後、ビニールテープ 1 枚で厚みをつけたスライドガラスを用いて、50%グリセロール中にマウントした。腹部第 4 または第 5 体節（A4 or A5）に存在する v^{ada} ニューロンを撮影した。

6.4.2. ホールマウント蛹の観察

蛹を両面テープの上に乘せ、ピンセットで囲蛹殻を剥き、傷つけないように

蛹を取り出した。その後、脚を切断し、ビニールテープ2枚で厚みをつけたスライドガラスを用いて、50%グリセロール中にマウントした。腹部第4または第5体節（A4 or A5）に存在する v'ada ニューロンを撮影した。

5.4.3. 画像の取得

Venus を発現する個体を観察する場合は Zeiss LSM510 共焦点顕微鏡を、GFP を発現する個体の観察には Nikon C1 共焦点顕微鏡を用いた。観察倍率は、Zeiss LSM510 共焦点顕微鏡の場合は 63 倍の水浸対物レンズ (0.7 倍ズーム) を用いて、Nikon C1 共焦点顕微鏡の場合は 40 倍の油浸対物レンズを用いて観察した。全ての画像は 1 μm 刻みで撮影した。

6.4.4. ホールマウント蛹のタイムラプス観察

観察に用いる個体は、一度三齢幼虫で観察し、腹部第5体節（A5）に v'ada のクローンが存在する個体を選別した。それらの幼虫は再度エサに戻し、蛹まで発生させた。70-74 hr APF の蛹を囲蛹殻から取り出し、35mm のガラスベースディッシュに置いた。腹部の上にある脚をつまみ、「バンザイ」の姿勢になるように脚を頭部の横に移動させ、腹部を直接ディッシュに接地させた。その後、共焦点顕微鏡で観察しながら、接地面内に観察対象が入るように蛹の角度を調節した。また、乾燥を防ぐため、小さく折りたたんで水を含ませたキムワイプをディッシュの中に入れた。全ての画像は、2 μm 刻みで 10~20 枚の範囲を、2 分間隔で 1 時間、Nikon C1 共焦点顕微鏡を用いて撮影した。画像の取得後、それぞれの蛹は 25°C で発生させ、成虫まで発生することを確認した。

6.5. 定量化と統計処理

6.5.1. 樹状突起パターンの定量化

取得した 3 次元画像を、Fiji のプラグインである Simple Neurite Tracer を用いてトレースし、メタデータを csv 形式で出力した。このメタデータは、各セグメ

ントの始点と終点の三次元座標、セグメント長、そして根元と先端がどのセグメントにつながっているかといった情報が含まれている。その後、Excel (Microsoft) を用いて、全てのセグメント長の和を計算することで総突起長を、先端に何もついていないセグメントの数を数えることで末端数を、それぞれ定量化した。樹状突起サイズについては、3次元のトレース画像を重ね合わせた2次元画像を作成し、Fijiのconvex hullプラグインを用いて、樹状突起を囲む凸多角形の面積として定義した。ある図形に外接する凸多角形は一意に定まるため、測定者による誤差が少ないと考えこの定義を採用した。Strahler 次数については、メタデータを元に、自作のマクロを用いて計算した。結果は平均値±標準偏差で表示した。

6.5.2. 樹状突起ダイナミクスの定量化

取得した4次元画像をz方向に重ね合わせ、xytの3次元画像を作成した。そして、FijiのプラグインであるSimple Neurite Tracerを用いて各時刻での末端の突起の長さを定量化した。メタデータをcsv形式で出力し、Excel (Microsoft) を用いて伸長・退縮の頻度や割合を定量化した。また、突起ダイナミクスの指標として、Fano factor (FF) を計算した。FFは、観測時間中におけるそれぞれの末端の突起の長さの分散を平均値で割った値で、比較的バイアスが少ないダイナミクスの定量化方法だと報告されている (Chen et al., 2011; Lee et al., 2008)。樹状突起ダイナミクスの解析には、以前の研究からダイナミックな細胞とされている、FFが0.35以上の細胞のみを対象とした (Lee et al., 2008)。分岐の頻度については、時刻tから時刻t+1で新たにできた突起の数を、時刻tでの突起長で割ることによって計算した。結果は平均値±標準誤差で表示した。

6.5.3. 統計処理

2条件の比較の場合はStudent's t-testを、3条件以上の比較にはone-way ANOVA with Tukey's HSD post hoc testを用いた。

6.6. 培養細胞とトランスフェクション、RNAi

S2 (Schneider's cell line 2) 細胞の培養は、25℃の空気下で、細胞培養用のシャーレやフラスコを用いて行った。培養液として Schneider's Drosophila Medium (Gibco BRL) に非動化した牛胎児血清 (FBS) 10%を加えたものを用いた。

S2 細胞でのトランスジェンの発現には、UAS コンストラクトと Actin5c-Gal4 コンストラクトを 1:1 の重量比で混合し、HilyMax (同仁化学研究所) を用いてトランスフェクションした。

S2 細胞での RNAi 実験には以下の方法を用いた。2x10⁶ の細胞を、FBS を含まない培養液 400 ml に懸濁し、12 ウェルプレートに播き、8 µg の dsRNA を加えて 30 分間静置する。その後 FBS を含む培養液 600 µl を加え、25℃で 3 日間培養してから細胞を回収し、その後の実験に用いた。

6.7. 生化学関連

6.7.1. 抗体作製

CHORD の 200 アミノ酸残基 (1-200 aa) の N 末端側に GST を融合したタンパク質を大腸菌 BL21(DE3)/pLysS 株で発現させて回収し、モルモットに免疫した。

6.7.2. ウェスタンブロッティング

解析に用いる試料を適切な量の 2xSDS サンプルバッファーに溶解し、サンプルを SDS-PAGE で分離した。各試料の濃度については対応する図のレジェンドに記載した。ゲルは WIDE RANGE Gel Preparation Buffer (4X) for PAGE (ナカライテスク) を用いて作製し、ブロットするタンパク質のサイズに応じて、8%もしくは 10%を用いた。ブロットには Immobilon-P (Millipore) を用いた。ブロッキングは 0.5~5%のスkimミルクを含む TBS を、洗浄には 0.05% Tween-20 を含む TBS を用いた。シグナルは Chemi-Lumi One Super (ナカライテスク) を用いて検出した。一部の実験において、シグナルを増強するために Can Get Signal

Immunoreaction Enhancer solution (TOYOBO) を用いた。使用した抗体の動物種や濃度は表 3 にまとめた。

抗体名	動物種など	希釈倍率	参考文献/企業名
CHORD#2	guinea pig; polyclonal	1:1000	自作
M2 (FLAG)	mouse; monoclonal	1:1000	Sigma
P-T398-S6K	rabbit; polyclonal	1:1000	Cell Signaling (#9209)
P-S505-Akt	rabbit; polyclonal	1:1000	Cell Signaling (#4054)
Akt	rabbit; polyclonal	1:1000	Cell Signaling (#9272)
P-Sqh	rabbit; polyclonal	1:1000	Cell Signaling (#3671)
Sqh	rabbit; polyclonal	1:1000	Jordan and Karess, 1997
C4 (Actin)	mouse; monoclonal	1:1000	Millipore (MAB1501)

表 3. 実験に用いた抗体

6.7.3. 免疫沈降

ショウジョウバエ成虫の頭部の回収法と免疫沈降実験は松原, 2013 と同じ方法を用いた。簡潔に方法を述べると、金属製のふるいを用いて頭部のみを回収し、液体窒素で凍結させた乳鉢と乳房を用いて粉碎し、適当な可溶化バッファーを加え、電動ホモジェナイザー (Digital Homogenizer, Iuchi) ですり潰した後、4℃で 1 時間転倒混和した。遠心処理 (8,000G、30 分) を行って回収した上清に、sepharose 4B beads (GE healthcare) を加えて 4℃で 30 分間混和した。遠心して上清を回収し、ANTI-FLAG M2 Affinity Gel (Sigma) に加えて 4℃で 2 時間混和した。TBS で 3 回洗浄し、100 ng/μl の 3xFLAG ペプチド (Sigma) 150 μl を加えて溶出し、4x SDS サンプルバッファー 50 μl を加えた。

培養細胞の免疫沈降については、 5×10^6 の細胞に 6.6 の方法でトランスフェクションを行い、48 時間後に細胞を回収した。回収した細胞は適当な可溶化バッファー 1 ml を加えて 4℃で 30 分間転倒混和した。遠心処理 (14,000G、20 分) を行って回収した上清 800 μl に、Pierce Protein A/G Magnetic Beads (Thermo) 25 μl

を加えて 4℃で 30 分間混和した。ビーズを磁石に吸着させて回収した上清に抗 FLAG 抗体 (M2; Sigma) 5 μ l を加えて 4℃で 1 時間混和し、Pierce Protein A/G Magnetic Beads (Thermo) 25 μ l を加えて 4℃でさらに 1 時間混和した。上清を除き、可溶化バッファーを用いてビーズを 2 回洗浄し、洗浄バッファー（可溶化バッファーから界面活性剤を除いた溶液）を用いてさらに 3 回洗浄した。2x SDS サンプルバッファー 25 μ l を加えて 65℃で 45 分間インキュベートして免疫沈降産物を溶出した。

6.7.4. ポリアクリルアミドゲルの銀染色

免疫沈降の実験結果の確認には、タンパク質を SDS-PAGE で分離した後、2D-銀染色試薬「第一」（第一化学薬品）を用いてゲルの染色を行った。

6.8. コンピュータシミュレーション

シミュレーションは 2 次元空間で行った。樹状突起の伸長と分岐はセグメントを付加することで、突起の伸長・退縮の速度はセグメントの長さとして、それぞれ表現した。伸長の方向は根元のセグメントの伸長方向を 0° として、-7.5° から 7.5° の一様分布に基づいて決定した。分岐の角度は、成虫 v'ada ニューロンの樹状突起の分岐角度の分布（データは示さない）を元に近似した正規分布（平均 97°、標準偏差 38°）からサンプリングした。初期条件としては、y 軸に平行で正または負の方向に 20 セグメント伸長させ、y 軸となす角が $\pm 30^\circ$ の方向に分岐をさせ、さらに 10 セグメント伸長させたものを用いた。実際に用いたパラメータの値については表 4 にまとめた。

パラメータ		値	
記号	説明	wild type	<i>CHORD</i> ²
L	1 セグメントの長さ	0.9 μm	0.75 μm
X	計算する空間の幅	600 μm	
Y	計算する空間の高さ	600 μm	
T	計算時間	3000 min	
pe	伸長確率	0.51	
pr	退縮確率	0.47	
pl	1 セグメント当たりの分岐確率	0.002	0.0017

表 4. シミュレーションの条件

引用文献

- Amano, M., Nakayama, M., and Kaibuchi, K. (2010). Rho-kinase/ROCK: A key regulator of the cytoskeleton and cell polarity. *Cytoskeleton (Hoboken)* 67, 545-554.
- Azevedo, R.B., French, V., and Partridge, L. (2002). Temperature modulates epidermal cell size in *Drosophila melanogaster*. *J Insect Physiol* 48, 231-237.
- Beadle, G.W., Tatum, E.L., and Clancy, C.W. (1938). Food level in relation to rate of development and eye pigmentation in *Drosophila melanogaster*. *Biological Bulletin* 75, 447-462.
- Benavides-Piccione, R., Hamzei-Sichani, F., Ballesteros-Yáñez, I., DeFelipe, J., and Yuste, R. (2006). Dendritic size of pyramidal neurons differs among mouse cortical regions. *Cereb Cortex* 16, 990-1001.
- Brancaccio, M., Menini, N., Bongioanni, D., Ferretti, R., De Acetis, M., Silengo, L., and Tarone, G. (2003). Chp-1 and melusin, two CHORD containing proteins in vertebrates. *FEBS Lett* 551, 47-52.
- Brand, A.H., and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401-415.
- Brogiolo, W., Stocker, H., Ikeya, T., Rintelen, F., Fernandez, R., and Hafen, E. (2001). An evolutionarily conserved function of the *Drosophila* insulin receptor and insulin-like peptides in growth control. *Curr Biol* 11, 213-221.
- Buchon, N., Poidevin, M., Kwon, H.M., Guillou, A., Sottas, V., Lee, B.L., and Lemaitre, B. (2009). A single modular serine protease integrates signals from pattern-recognition receptors upstream of the *Drosophila* Toll pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 12442-12447.
- Böhni, R., Riesgo-Escovar, J., Oldham, S., Brogiolo, W., Stocker, H., Andruss, B.F., Beckingham, K., and Hafen, E. (1999). Autonomous control of cell and organ size by CHICO, a *Drosophila* homolog of vertebrate IRS1-4. *Cell* 97, 865-875.
- Chen, J.L., Lin, W.C., Cha, J.W., So, P.T., Kubota, Y., and Nedivi, E. (2011). Structural basis for the role of inhibition in facilitating adult brain plasticity. *Nat Neurosci* 14, 587-594.
- Cheng, L.Y., Bailey, A.P., Leever, S.J., Ragan, T.J., Driscoll, P.C., and Gould, A.P. (2011). Anaplastic lymphoma kinase spares organ growth during nutrient restriction in *Drosophila*. *Cell* 146, 435-447.
- Defelipe, J. (2011). The evolution of the brain, the human nature of cortical circuits, and intellectual creativity. *Front Neuroanat* 5, 29.
- Di Giammartino, D.C., Nishida, K., and Manley, J.L. (2011). Mechanisms and

consequences of alternative polyadenylation. *Mol Cell* 43, 853-866.

Edgar, B.A. (2006). How flies get their size: genetics meets physiology. *Nat Rev Genet* 7, 907-916.

Facchinetti, V., Ouyang, W., Wei, H., Soto, N., Lazorchak, A., Gould, C., Lowry, C., Newton, A.C., Mao, Y., Miao, R.Q., *et al.* (2008). The mammalian target of rapamycin complex 2 controls folding and stability of Akt and protein kinase C. *EMBO J* 27, 1932-1943.

Ferretti, R., Palumbo, V., Di Savino, A., Velasco, S., Sbroggiò, M., Sportoletti, P., Micale, L., Turco, E., Silengo, L., Palumbo, G., *et al.* (2010). Morgana/chp-1, a ROCK inhibitor involved in centrosome duplication and tumorigenesis. *Dev Cell* 18, 486-495.

Ferretti, R., Sbroggiò, M., Di Savino, A., Fusella, F., Bertero, A., Michowski, W., Tarone, G., and Brancaccio, M. (2011). Morgana and melusin: two fairies chaperoning signal transduction. *Cell Cycle* 10, 3678-3683.

Gao, F.B., Brenman, J.E., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (1999). Genes regulating dendritic outgrowth, branching, and routing in *Drosophila*. *Genes Dev* 13, 2549-2561.

Grueber, W.B., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (2002). Tiling of the *Drosophila* epidermis by multidendritic sensory neurons. *Development* 129, 2867-2878.

Hietakangas, V., and Cohen, S.M. (2007). Re-evaluating AKT regulation: role of TOR complex 2 in tissue growth. *Genes Dev* 21, 632-637.

Huxley, J.S., and Tessier, G. (1936). Terminology of relative growth. *Nature* 137, 780-781.

Ikenoue, T., Inoki, K., Yang, Q., Zhou, X., and Guan, K.L. (2008). Essential function of TORC2 in PKC and Akt turn motif phosphorylation, maturation and signalling. *EMBO J* 27, 1919-1931.

Jan, Y.N., and Jan, L.Y. (2010). Branching out: mechanisms of dendritic arborization. *Nat Rev Neurosci* 11, 316-328.

Jaworski, J., and Sheng, M. (2006). The growing role of mTOR in neuronal development and plasticity. *Mol Neurobiol* 34, 205-219.

Jaworski, J., Spangler, S., Seeburg, D.P., Hoogenraad, C.C., and Sheng, M. (2005). Control of dendritic arborization by the phosphoinositide-3'-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin pathway. *J Neurosci* 25, 11300-11312.

Kadota, Y., Shirasu, K., and Guerois, R. (2010). NLR sensors meet at the SGT1-HSP90 crossroad. *Trends Biochem Sci* 35, 199-207.

Koike-Kumagai, M., Yasunaga, K., Morikawa, R., Kanamori, T., and Emoto, K. (2009). The target of rapamycin complex 2 controls dendritic tiling of *Drosophila* sensory neurons through the Tricornered kinase signalling pathway. *EMBO J* 28, 3879-3892.

Kubo, T., Wada, T., Yamaguchi, Y., Shimizu, A., and Handa, H. (2006). Knock-down of 25 kDa subunit of cleavage factor Im in Hela cells alters alternative polyadenylation within 3'-UTRs. *Nucleic Acids Res* 34, 6264-6271.

Kumar, V., Zhang, M.X., Swank, M.W., Kunz, J., and Wu, G.Y. (2005). Regulation of dendritic morphogenesis by Ras-PI3K-Akt-mTOR and Ras-MAPK signaling pathways. *J Neurosci* 25, 11288-11299.

Kuo, C.T., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (2005). Dendrite-specific remodeling of *Drosophila* sensory neurons requires matrix metalloproteases, ubiquitin-proteasome, and ecdysone signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 15230-15235.

Laplane, M., and Sabatini, D.M. (2012). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149, 274-293.

Lee, T., and Luo, L. (1999). Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis. *Neuron* 22, 451-461.

Lee, W.C., Chen, J.L., Huang, H., Leslie, J.H., Amitai, Y., So, P.T., and Nedivi, E. (2008). A dynamic zone defines interneuron remodeling in the adult neocortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 19968-19973.

Lloyd, A.C. (2013). The regulation of cell size. *Cell* 154, 1194-1205.

London, M., and Häusser, M. (2005). Dendritic computation. *Annu Rev Neurosci* 28, 503-532.

Lutz, C.S., and Moreira, A. (2011). Alternative mRNA polyadenylation in eukaryotes: an effective regulator of gene expression. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2, 22-31.

McGuire, S.E., Le, P.T., Osborn, A.J., Matsumoto, K., and Davis, R.L. (2003). Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in *Drosophila*. *Science* 302, 1765-1768.

Michowski, W., Ferretti, R., Wisniewska, M.B., Ambrozkiwicz, M., Beresewicz, M., Fusella, F., Skibinska-Kijek, A., Zablocka, B., Brancaccio, M., Tarone, G., *et al.* (2010). Morgana/CHP-1 is a novel chaperone able to protect cells from stress. *Biochim Biophys Acta* 1803, 1043-1049.

Mirth, C.K., and Riddiford, L.M. (2007). Size assessment and growth control: how adult size is determined in insects. *Bioessays* 29, 344-355.

Mirth, C.K., and Shingleton, A.W. (2012). Integrating body and organ size in *Drosophila*: recent advances and outstanding problems. *Front Endocrinol (Lausanne)* 3, 49.

Oh, W.J., and Jacinto, E. (2011). mTOR complex 2 signaling and functions. *Cell Cycle* 10, 2305-2316.

Ohara, P.T., and Havton, L.A. (1994). Preserved features of thalamocortical projection neuron dendritic architecture in the somatosensory thalamus of the rat, cat and macaque.

Brain Res 648, 259-264.

Parrish, J.Z., Emoto, K., Kim, M.D., and Jan, Y.N. (2007). Mechanisms that regulate establishment, maintenance, and remodeling of dendritic fields. *Annu Rev Neurosci* 30, 399-423.

Parrish, J.Z., Xu, P., Kim, C.C., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (2009). The microRNA bantam functions in epithelial cells to regulate scaling growth of dendrite arbors in drosophila sensory neurons. *Neuron* 63, 788-802.

Pete, G., Fuller, C.R., Oldham, J.M., Smith, D.R., D'Ercole, A.J., Kahn, C.R., and Lund, P.K. (1999). Postnatal growth responses to insulin-like growth factor I in insulin receptor substrate-1-deficient mice. *Endocrinology* 140, 5478-5487.

Powell, L.M., Zur Lage, P.I., Prentice, D.R., Senthinathan, B., and Jarman, A.P. (2004). The proneural proteins Atonal and Scute regulate neural target genes through different E-box binding sites. *Mol Cell Biol* 24, 9517-9526.

Proudfoot, N. (2004). New perspectives on connecting messenger RNA 3' end formation to transcription. *Curr Opin Cell Biol* 16, 272-278.

Rajan, A., and Perrimon, N. (2012). Drosophila cytokine unpaired 2 regulates physiological homeostasis by remotely controlling insulin secretion. *Cell* 151, 123-137.

Sato, D., Sugimura, K., Satoh, D., and Uemura, T. (2010). Crossveinless-c, the Drosophila homolog of tumor suppressor DLC1, regulates directional elongation of dendritic branches via down-regulating Rho1 activity. *Genes Cells* 15, 485-500.

Satoh, D., Sato, D., Tsuyama, T., Saito, M., Ohkura, H., Rolls, M.M., Ishikawa, F., and Uemura, T. (2008). Spatial control of branching within dendritic arbors by dynein-dependent transport of Rab5-endosomes. *Nat Cell Biol* 10, 1164-1171.

Schmidt-Nielsen, K. (1984). *Scaling, why is Animal Size So Important?* (Cambridge University Press).

Schuldiner, O., Berdnik, D., Levy, J.M., Wu, J.S., Luginbuhl, D., Gontang, A.C., and Luo, L. (2008). piggyBac-based mosaic screen identifies a postmitotic function for cohesin in regulating developmental axon pruning. *Dev Cell* 14, 227-238.

Shimono, K., Fujimoto, A., Tsuyama, T., Yamamoto-Kochi, M., Sato, M., Hattori, Y., Sugimura, K., Usui, T., Kimura, K., and Uemura, T. (2009). Multidendritic sensory neurons in the adult Drosophila abdomen: origins, dendritic morphology, and segment- and age-dependent programmed cell death. *Neural Dev* 4, 37.

Shirasu, K., Lahaye, T., Tan, M.W., Zhou, F., Azevedo, C., and Schulze-Lefert, P. (1999). A novel class of eukaryotic zinc-binding proteins is required for disease resistance signaling in barley and development in *C. elegans*. *Cell* 99, 355-366.

Simões, S.e.M., Blankenship, J.T., Weitz, O., Farrell, D.L., Tamada, M.,

Fernandez-Gonzalez, R., and Zallen, J.A. (2010). Rho-kinase directs Bazooka/Par-3 planar polarity during *Drosophila* axis elongation. *Dev Cell* *19*, 377-388.

Song, W., Onishi, M., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (2007). Peripheral multidendritic sensory neurons are necessary for rhythmic locomotion behavior in *Drosophila* larvae. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 5199-5204.

Staveley, B.E., Ruel, L., Jin, J., Stambolic, V., Mastronardi, F.G., Heitzler, P., Woodgett, J.R., and Manoukian, A.S. (1998). Genetic analysis of protein kinase B (AKT) in *Drosophila*. *Curr Biol* *8*, 599-602.

Stocker, H., and Hafen, E. (2000). Genetic control of cell size. *Curr Opin Genet Dev* *10*, 529-535.

Stuart, G., Spruston, N., and Häusser, M. (2007). *Dendrites* (Oxford University Press).

Su, T.T., and O'Farrell, P.H. (1998). Size control: cell proliferation does not equal growth. *Curr Biol* *8*, R687-689.

Sugimura, K., Yamamoto, M., Niwa, R., Satoh, D., Goto, S., Taniguchi, M., Hayashi, S., and Uemura, T. (2003). Distinct developmental modes and lesion-induced reactions of dendrites of two classes of *Drosophila* sensory neurons. *J Neurosci* *23*, 3752-3760.

Swiech, L., Blazejczyk, M., Urbanska, M., Pietruszka, P., Dortland, B.R., Malik, A.R., Wulf, P.S., Hoogenraad, C.C., and Jaworski, J. (2011). CLIP-170 and IQGAP1 cooperatively regulate dendrite morphology. *J Neurosci* *31*, 4555-4568.

Taipale, M., Jarosz, D.F., and Lindquist, S. (2010). HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. *Nat Rev Mol Cell Biol* *11*, 515-528.

Teeter, C.M., and Stevens, C.F. (2011). A general principle of neural arbor branch density. *Curr Biol* *21*, 2105-2108.

Tennessen, J.M., and Thummel, C.S. (2011). Coordinating growth and maturation - insights from *Drosophila*. *Curr Biol* *21*, R750-757.

Thomanetz, V., Angliker, N., Cloëtta, D., Lustenberger, R.M., Schweighauser, M., Oliveri, F., Suzuki, N., and Rüegg, M.A. (2013). Ablation of the mTORC2 component rictor in brain or Purkinje cells affects size and neuron morphology. *J Cell Biol* *201*, 293-308.

Thorne, N., and Amrein, H. (2008). Atypical expression of *Drosophila* gustatory receptor genes in sensory and central neurons. *J Comp Neurol* *506*, 548-568.

Tumaneng, K., Russell, R.C., and Guan, K.L. (2012). Organ size control by Hippo and TOR pathways. *Curr Biol* *22*, R368-379.

Urbanska, M., Gozdz, A., Swiech, L.J., and Jaworski, J. (2012). Mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) and 2 (mTORC2) control the dendritic arbor morphology of hippocampal neurons. *J Biol Chem* *287*, 30240-30256.

- Williams, D.W., and Truman, J.W. (2004). Mechanisms of dendritic elaboration of sensory neurons in *Drosophila*: insights from in vivo time lapse. *J Neurosci* 24, 1541-1550.
- Williams, D.W., and Truman, J.W. (2005). Remodeling dendrites during insect metamorphosis. *J Neurobiol* 64, 24-33.
- Wilmanski, J.M., Petnicki-Ocwieja, T., and Kobayashi, K.S. (2008). NLR proteins: integral members of innate immunity and mediators of inflammatory diseases. *J Leukoc Biol* 83, 13-30.
- Winter, C.G., Wang, B., Ballew, A., Royou, A., Karess, R., Axelrod, J.D., and Luo, L. (2001). *Drosophila* Rho-associated kinase (Drok) links Frizzled-mediated planar cell polarity signaling to the actin cytoskeleton. *Cell* 105, 81-91.
- Wittenberg, G., and Wang, S. (2007). Evolution and scaling of dendrites. In *Dendrites*, G. Stuart, N. Spruston, and M. Häusser, eds. (Oxford University Press), pp. 43-67.
- Wu, J., Luo, S., Jiang, H., and Li, H. (2005). Mammalian CHORD-containing protein 1 is a novel heat shock protein 90-interacting protein. *FEBS Lett* 579, 421-426.
- Xiang, Y., Yuan, Q., Vogt, N., Looger, L.L., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (2010). Light-avoidance-mediating photoreceptors tile the *Drosophila* larval body wall. *Nature* 468, 921-926.
- Yamamoto, M., Ueda, R., Takahashi, K., Saigo, K., and Uemura, T. (2006). Control of axonal sprouting and dendrite branching by the Nrg-Ank complex at the neuron-glia interface. *Curr Biol* 16, 1678-1683.
- Zhang, H., Stallock, J.P., Ng, J.C., Reinhard, C., and Neufeld, T.P. (2000). Regulation of cellular growth by the *Drosophila* target of rapamycin dTOR. *Genes Dev* 14, 2712-2724.
- Zinzalla, V., Stracka, D., Oppliger, W., and Hall, M.N. (2011). Activation of mTORC2 by association with the ribosome. *Cell* 144, 757-768.
- 佐藤, 大. (2008). 樹状突起の分岐を制御する機構の研究.
- 松原, 大. (2013). 樹状突起パターン形成における姉妹突起間反発機構の研究.

謝辞

本研究は、京都大学生命科学研究科の上村匡教授のご指導のもと約7年にわたって行われ、その間多くの方のお世話になりました。

本論文を結ぶにあたり、まず指導教員である上村匡先生に感謝いたします。上村先生には、アカデミアの研究者にとって大事なものが何かを教えていただきました。また、上村先生のご紹介のおかげで、多くの研究者の方々にめぐり合い、勉強させていただく機会を得ることができました。さらに上村先生には、佐藤元彦君、野村尚史君、岡本恵美さん、大橋正義君、駒井英恵さんの研究を指導する機会を与えていただきました。指導する立場ながら、彼らからは逆に教わるばかりでした。大学院生活を通して私が少しでも成長できたとしたら、至らない先輩だった私に着いてきてくれた彼らのおかげだと思います。心より感謝いたします。

他の上村研究室のメンバーにも、公私共に大変お世話になりました。千坂修準教授には普段から気にかけていただき、研究がうまくいかずに落ち込んでいた時にも温かいお言葉をかけていただきました。碓井理夫助教には、研究のいろはを教えていただいただけでなく、研究の分かれ道ではいつも重要な助言をいただきました。SOP-FLPの作製も碓井博士の助言に端を発したものです。佐藤大祐博士、春本敏之博士、津山泰一氏には、研究者としての心構えや姿勢を教えていただきました。佐藤太一博士と毛利亘輔博士には、いつも鋭いご指摘をいただくなど、厳しくも温かいご指導をしていただきました。同級生の松原大佑博士、高山雄太氏には、厳しい意見も言い合える仲間として大学院生活を支えていただきました。OBでもある丹羽隆介博士には、折に触れて多くのご助言と激励のお言葉をいただきました。二股真由美さんにはショウジョウバエの餌の作製など実験補助のお仕事を、三宅由希子さん、清水久美子さん、水越絢子さん、沖かなえさんには事務のお仕事を通じて、大学院での研究を支援していただきました。また、ここに挙げていない研究室の方々にも、公私両面にわ

たって多大なご支援をいただきました。改めて感謝いたします。

さらに、本研究には多くの方々のご協力がありました。次世代シーケンサによる全ゲノム配列の決定は、国立遺伝学研究所の豊田敦準教授に行っていただきました。また、全ゲノム配列のデータ解析には、京都大学理学研究科の布施直之博士、西村理博士、井筒弥那子さんにアドバイスしていただきました。ショウジョウバエ頭部の抽出物の質量分析については、京都大学生命科学研究科の石川冬木教授のもとで、渡邊祐三氏に行っていただきました。培養細胞の抽出物の質量分析は名古屋大学医学系研究科貝淵弘三教授のもと西岡朋生助教に行っていただきました。ショウジョウバエの体のサイズを変える方法については、理化学研究所発生・再生科学総合研究センターの西村隆史チームリーダーと岡本直樹博士にアドバイスをいただきました。蛹の解剖の方法や、蛹への薬剤の投与方法については、北海道教育大学の木村賢一教授に教えていただきました。コンピュータシミュレーションの基礎は、理化学研究所の望月敦史主任研究員と京都大学物質細胞統合システム拠点 (iCeMS) の杉村薫助教にご指導いただきました。iCeMS の見学美根子教授と藤島和人助教には、共同研究者として本研究にご協力いただいただけでなく、研究方針や論文執筆のアドバイスもいただきました。京都大学生命科学研究科の米原伸教授には、DNA シーケンサなどの研究機器を使用させていただきました。Yuh-Nang Jan 教授、BingYe 準教授、千原崇裕準教授、榎本和生教授、Lynn Powell 博士、Lemaitre Bruno 教授、Stephen Cohen 教授、丹羽隆介準教授、西村隆史チームリーダー、林茂生グループディレクター、Roger Karess グループリーダー、Jennifer A. Zallen 博士には、ショウジョウバエ系統や DNA、抗体などの研究材料を分与していただきました。この他にも、京都工芸繊維大学ショウジョウバエ遺伝資源センター、Bloomington Stock Center、Vienna Drosophila RNAi Center からショウジョウバエ系統をいただきました。本当にありがとうございました。また私は、平成 22 年 4 月から平成 25 年 3 月まで、学術振興会特別研究員 (DC1) として研究に従事しました。学術振興会に感謝いたします。

最後に、これまでの私の研究生活を支えてくれた家族や友人たちに心より感謝いたします。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Kohei Shimono, Kazuto Fujishima, Takafumi Nomura, Masayoshi Ohashi, Tadao Usui, Mineko Kengaku, Atsushi Toyoda & Tadashi Uemura

An evolutionarily conserved protein CHORD regulates scaling of dendritic arbors with body size

Scientific Reports, in press, 2014

平成 26 年 3 月 11 日

下野耕平